



# **EXTRACTOS AQUOSOS DE PTEROSPARTUM TRIDENTATUM L. TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE.**

**Ana Catarina Mendes Pimenta**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins

Co-orientador: Mestre Maria Teresa Pita Pegado Gonçalves Rodrigues Coelho

## **Júri:**

Presidente: Doutora Ana Maria Silva Monteiro, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

- Doutor Vitor Manuel Delgado Alves, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

- Doutora Sara Maria Beirão da Costa Teixeira de Barros, Professora Auxiliar Convidada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

- Mestre Maria Teresa Pita Pegado Gonçalves Rodrigues Coelho, Professora Adjunta da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Lisboa, 2012

## AGRADECIMENTO

---

Ao finalizar a elaboração deste trabalho, dissertação de Mestrado, não queria deixar de agradecer e salientar o meu reconhecimento a todas as pessoas pelas quais manifesto o meu sincero respeito e consideração, e que contribuíram das mais diversas formas permitindo que se conseguissem ultrapassar todos os obstáculos impostos à realização deste trabalho.

À professora Doutora Margarida Moldão, na qualidade de minha orientadora no Instituto Superior de Agronomia, pela orientação ao longo do trabalho e pelo interesse que sempre demonstrou.

À professora Teresa Coelho, co-orientadora pela ajuda e disponibilidade constante, e sobretudo por me ter dado algumas directrizes e orientações.

À professora Doutora Amarílis de Varennes pela disponibilidade de ceder o equipamento presente no laboratório, no qual realizei todo o processo de liofilização.

Também agradeço à equipa de investigadores/ alunos e auxiliares pela simpatia e boa disposição.

A todos aqueles, que embora não explicitamente mencionados me ajudaram a atingir os meus objectivos.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A carqueja, *Pterospartum tridentatum* L., é um arbusto comum na zona centro, montanhosa e em terrenos ácidos, com diferentes utilizações, na medicina tradicional e gastronomia. Com o objectivo de avaliar a eventual produção de extractos aquosos desta planta, estudou-se a época de colheita adequada, o tempo de extracção, sendo caracterizado o rendimento de extracção, o teor em fenóis (TF) e actividade antioxidante (AA). O estudo foi efectuado com amostras colhidas nas serras da Malcata e Gardunha no qual foram submetidas a extracções consecutivas em água. O extracto aquoso foi recuperado e liofilizado. O rendimento mais elevado foi no período de repouso, com 46 e 25% m/m (m.s.) em plantas da Malcata e Gardunha, respectivamente. Observou-se que aos 120 minutos a massa de extracto recuperada foi em média superior a 75%. O TF foi avaliado pela medida da absorvância a 280 nm em soluções aquosas e os valores variaram entre 245 e 400 mg ácido gálico/g (m.s.) não diferindo os valores em relação à zona de colheita. É provável que diferentes TF sejam extraídos nos diferentes tempos de extracção. A AA dos extractos foi determinada pelo método radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila. A maior AA foi observada nos extractos das flores, 2 mMTrolox/100g (m.s.). Os resultados permitem concluir sobre o interesse da produção de extractos de carqueja.

**Palavras-chave:** *Pterospartum tridentatum*; Extracto aquoso; Rendimento de extracção; Actividade antioxidante; Teor de fenóis.

## ABSTRACT

Carqueja, *Pterospartum tridentatum* L., is a shrub common in mountainous areas and acids land, used in traditional medicine and gastronomy. In order to evaluate the eventual production of extracts of this plant, the effect of harvest period and extraction time on yield, phenolic content (PC) and antioxidant activity (AA) of the extracts was studied. Plant samples, harvested in Malcata and Gardunha mountains, were subjected to consecutive extraction steps in boiling water. After each step the aqueous phase was recovered and liophilized. The highest yield extraction was obtained in the dormancy period, with 46 and 25 % m/m (d.m) in plants of Malcata and Gardunha. It was observed at 120minutes the mass of extract recovered was on average more than 75%. No substantial variation of PC, evaluated by measuring the absorbance at 280nm in aqueous solutions, was observed throughout the consecutive extracts. PC ranged from 245 to 400 mg gallic acid equivalents per g (d.m.). Probably different phenolic compounds are extracted at different rates and there are other compounds co-extracted. The AA was determined by the radical scavenging activity method using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. The greatest radical scavenging activity was observed in the flowers extracts (2mMTrolox/100g d.m.), no significant differences were observed for the different batches. Due to its AA the results suggest the interest on the production of carqueja extracts.

**key-words:** *Pterospartum tridentatum*; Aqueous extracts; Extraction yield; Antioxidant activity; Phenolic content

## EXTENDED ABSTRACT

*Pterospartum tridentatum* L. Willk. [= *Chamaespartium tridentatum* (L.) P. Gibbs.; *Genistella tridentata* (L.) is an European endemic Leguminosae (=Fabaceae) species belonging to the subfamily Papilionoideae and known as *carqueja* or *carqueija* in Portugal. This small shrub, growing up spontaneously to 100 cm, is very common in the mountains of the north of Portugal, showing yellow flowers, alternate branches and coriaceous winged stems.

The shrubs of *Pterospartum tridentatum* can usually be found in the understory of *Arbutus unedo*, *Pinus pinaster* and *Eucalyptus* forests and in abandoned lands with acidic soils. Since ancient times, spices and herbs have been added to different food systems to improve flavors and for their antioxidant or antimicrobial capacity. Some authors refer the use of *P. tridentatum* in popular medicine for colds, stomach aches, intestinal problems, kidney disease, liver and also for rheumatism. It is also indicated for pneumonia, bronchitis and tracheitis, for headaches, coughs, to lower blood pressure and cholesterol levels, diabetes and even weight loss programs. It is also used in cooking, as a condiment in rice and rabbit stew. The shrub is known for its diuretic, purgative, emollient, laxative, hypotensive, hypoglycemic and digestive properties. Bioactive compounds, such flavonoids, have been identified in aqueous extracts of those plants.

Plants synthesize compounds with biological activity, namely antioxidant, as secondary products, which are mainly phenolic compounds serving in plant defense mechanisms to counteract reactive oxygen species in order to avoid oxidative damage. Natural antioxidants, passes a protective action of the human body from free radicals and the advancement of certain chronic diseases. They are often presumed to be safe for consumption, due to their plant origin, but they may vary depending on the plant species and environmental factors that affect growth.

Natural antioxidants present in fruits, vegetables, herbs and species such as, phenolic compounds (flavonoids, phenolic acids and tannins), nitrogen containing compounds (alkaloids, amino acids, peptides and amines), carotenoids, tocopherols or ascorbic acid and its derivatives have been reported to be potential candidates in lowering cardiovascular diseases and anticarcinogenic activities. In addition the phenolic compounds can exhibit antioxidant, antiallergenic, antiarthrogenic, antiinflammatory, antimicrobial and antithrombotic effects.

Researchers are looking for natural antioxidants as alternative to synthetic antioxidants, such as butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hidroxyanisole (BHA) and *ter-*

butylhydroxyquinone (TBHQ) that are widely used in the food and pharmaceutical industries. Interest in plant-derived food additives has grown, because the consumption of synthetic antioxidants has been related to the possible health risks, so it resulted in strict regulations over their use in foods. Carqueja is an underexploited natural source of compounds with biological activity, which should be fully characterized aiming to its valorization.

In the present study, aerial parts of *P. tridentatum* plants were collected in two locations in Portugal (Malcata and Gardunha mountains), at different vegetative stages. In order to evaluate the eventual production of extracts of this plant, the effect of harvest period and extraction time on yield, phenolic content (PC) and antioxidant activity (AA) of the aqueous extracts was studied. Plant samples (25g), were subjected to consecutive extraction steps in boiling water (100mL). After each step the aqueous phase was recovered and lyophilized.

The influence of the seasonal variation in the yield and composition of the extracts was evaluated, in order to select the most appropriate harvest season at the best time of extraction. Among the populations assayed, the extraction yields have some differences with the harvest period being the highest yield extraction obtained in the dormancy period, using stem (46% m/m dry mass in Malcata and 25% m/m dry mass in Gardunha). The lowest extraction yield was obtained in the beginning of dormancy period using stems. It was observed that at 120 minutes the mass of extract recovered was on average more than 75%, of the whole extract obtained which can be considered an acceptable value if applicable in the industry.

The total phenolic content of the aqueous extracts was evaluated by measuring the absorbance at 280 nm and the values ranged between 245 to 400 mg gallic acid equivalents per g dry matter. The vegetative stage did not influence this total phenolic content. Probably different phenolic compounds are extracted at different rates and there are other compounds co-extracted.

The antioxidant activity of the solid extracts of *P. tridentatum*, was determined by the radical scavenging activity method using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH). The greatest DPPH radical scavenging activity was observed in the extracts from flowers (2 mM Trolox/ 100g dry matter). For the other extracts the DPPH radical scavenging activity was higher than 1 mM Trolox/ 100g dry matter and no significant differences were observed among them.

Due to its AA the results suggest the interest on the production of carqueja extracts.

# ÍNDICE

---

Agradecimento.....	I
Resumo.....	II
Abstract.....	III
Extended abstract.....	IV
Índice.....	VI
Índice de Figuras.....	VIII
Índice de Quadros.....	X
<b>1. Introdução e objectivos.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Enquadramento teórico.....</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Pterospartum tridentatum</i> L. (Carqueja).....	3
2.1.1 Caracterização botânica.....	3
2.1.2 Distribuição geográfica.....	4
2.1.3 Utilização a nível alimentar e não alimentar.....	6
2.2 Antioxidantes.....	7
2.2.1 Principais antioxidantes.....	8
2.2.1.1 Sintéticos.....	8
2.2.1.2 Naturais.....	9
2.2.2 Principais utilizações.....	11
2.2.3 Métodos de extracção de antioxidantes e determinação de capacidade antioxidante.....	12
<b>3. Desenvolvimento Experimental.....</b>	<b>14</b>
3.1 Materiais e Métodos.....	14
3.1.1 Material Vegetal.....	14
3.1.2. Métodos.....	15
3.1.2.1 Obtenção de extractos.....	15
3.1.2.2 Caracterização dos extractos.....	17
3.1.2.2.1 Determinação da humidade .....	17
3.1.2.2.2 Determinação do teor de fenóis totais.....	17
3.1.2.2.3 Determinação da actividade antioxidante.....	18
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>20</b>
4.1 Rendimento de extracção de extracção em função da fase do ciclo vegetativo e do tempo de extracção.....	20
4.2 Teor de fenóis totais .....	25
4.3 Actividade Antioxidante.....	28

4.4 Estudo da relação entre o teor em fenóis e a actividade antioxidante para os diferentes extractos.....	30
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>34</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>36</b>
<b>Anexos</b>	



# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1	Arbusto no seu <i>habitat</i> natural - Início do repouso do ciclo vegetativo .....	3
Figura 2	Carqueja na fase de floração.....	3
Figura 3	Flores de <i>Pterospartum tridentatum</i> , carqueja.....	4
Figura 4	Localização geográfica da Serra da Gardunha e Malcata .....	5
Figura 5	Estrutura dos antioxidantes sintéticos, BHA, BHT, PG e TBHQ.....	9
Figura 6	Mapa com locais de colheita de amostras de <i>Pterospartum tridentatum</i> L. ....	15
Figura 7	Aparelho de Clevenger modificado.....	16
Figura 8	Extracção das flores da carqueja .....	16
Figura 9	Liofilizador utilizado.....	16
Figura 10	Curva de calibração para a determinação de teor de fenóis.....	18
Figura 11	Curva de calibração para a determinação da actividade antioxidante.....	19
Figura 12	Curva cumulativa do rendimento de extração de <i>P. tridentatum</i> , colhido na serra da Malcata, nas várias fases de crescimento.....	20
Figura 13	Curva cumulativa do rendimento de extração de <i>P. tridentatum</i> , colhido na serra da Gardunha, nas várias fases de crescimento.....	21
Figura 14	Curvas cumulativas do rendimento de extracção de <i>P. tridentatum</i> .....	22
Figura 15	Teor de fenóis totais no extracto aquoso de carqueja, amostra Malcata.....	25
Figura 16	Teor de fenóis totais no extracto aquoso de carqueja, amostra Gardunha.....	26
Figura 17	Actividade antioxidante no extracto aquoso de carqueja, amostra Malcata.....	28
Figura 18	Actividade antioxidante no extracto aquoso de carqueja, amostra Gardunha....	29
Figura 19	Actividade antioxidante no extracto aquoso de flores carqueja.....	29

<i>Figura 20</i>	Relação do teor em fenóis e a actividade antioxidante na amostra da Malcata nos vários tempos de extracção .....	31
<i>Figura 21</i>	Relação do teor em fenóis e a actividade antioxidante na amostra da Gardunha nos vários tempos de extracção .....	32

# ÍNDICE DE QUADROS

---

<i>Quadro 1</i>	Identificação do material vegetal em estudo, fases do ciclo vegetativo, mês/ano de colheita e localização geográfica.....	14
<i>Quadro 2</i>	Coordenadas e altitude dos locais de colheita da espécie <i>P. tridentatum</i> L. ....	15
<i>Quadro 3</i>	Massa de extracto recuperado (%) em função do tempo de extracção das amostras Malcata e Gardunha.....	23

## **ANEXO**

<i>Quadro A</i>	Rendimento de extracção de <i>P. tridentatum</i> , Malcata e Gardunha, nas várias fases do ciclo vegetativo	
<i>Quadro B</i>	Teor de fenóis do extracto aquoso de carqueja, amostra Malcata.	
<i>Quadro C</i>	Teor de fenóis do extracto aquoso de carqueja, amostra Gardunha.	
<i>Quadro D</i>	Actividade antioxidante no extracto aquoso de carqueja, amostra Malcata.	
<i>Quadro E</i>	Actividade antioxidante no extracto aquoso de carqueja, amostra Gardunha.	

## 1. INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

---

Os conhecimentos populares sobre o uso das plantas em proveito do Homem baseiam-se em milénios de experiência humana. Como para qualquer animal, o saber identificar as plantas, distinguindo as comestíveis das não comestíveis e das tóxicas, foi sempre uma questão de sobrevivência. Por tentativa e erro o Homem aprendeu a conhecer e a utilizar as plantas e muitas adquiriram nas comunidades um papel mágico-religioso relevante que ainda hoje subsiste (Baptista, 2004).

Até meados do séc. XIX as plantas representam os principais agentes terapêuticos usados pelo Homem. Em finais do séc. XIX e inícios de XX a etnobotânica, começa a desenvolver-se como ciência, iniciando-se uma nova base de pesquisa farmacêutica. Grandes empresas farmacêuticas começam a investir financeiramente em importantes expedições etnobotânicas nas regiões tropicais, designadamente na América do Sul e em África, para recolher o conhecimento dos povos indígenas sobre plantas medicinais, com o intuito de *a posteriori* lançarem no mercado novos fármacos (Rodrigues, 2001).

O uso de plantas com fins medicinais no tratamento, cura e prevenção de doenças bem como uso a nível alimentar, não só como chá mas também como utilização a nível condimentar, é quase tão antigo quanto a espécie humana (Rodrigues, 2001). Observações sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais e aromáticas, comprovados pela população, contribuem de forma significativa para divulgar as virtudes dos vegetais, pelos efeitos medicinais, terapêuticos e sensoriais que produzem, apesar de a composição da maioria das plantas não ser conhecida (Carreira, 2007).

Desta forma, utilizadores de plantas aromáticas e medicinais (PAM) de todo o mundo, e sobretudo dos países em desenvolvimento, mantêm a prática da utilização/consumo de fitoquímicos, tornando válidas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. O uso popular de medicamentos ou fórmulas medicamentosas que empregam extractos totais ou parcialmente purificados, infusões ou óleos essenciais, representam uma parcela significativa no tratamento de doenças, principalmente em países em desenvolvimento (Carreira, 2007).

A colheita das PAM é maioritariamente efectuada pelas populações rurais que as usam em seu proveito ou as vendem directamente ou a intermediários, não existindo regras que limitem a colheita e o comércio da maioria das espécies, o que pode pôr em perigo a sobrevivência destas espécies ou provocar uma grave erosão da variabilidade genética (Baptista, 2004).

O uso de PAM é parte integrante da cultura Portuguesa uma vez que muitas são as suas possibilidades de utilização nas mais diversas situações. Existem PAM das mais diversas espécies, as quais apresentam consistência herbácea, semi-herbácea ou lenhosa, com aproveitamento apenas de uma parte da planta ou da totalidade.

Estas plantas para além da composição normal apresentam proporções variadas de compostos que conferem propriedades bioactivas especiais (Baptista, 2004). Os componentes responsáveis pela bioactividade diferenciam as plantas, designadamente no que se refere ao seu aroma, gosto, actividade antioxidante, actividade antimicrobiana, entre outras.

A actividade antioxidante é uma das propriedades que a nível de utilização alimentar é muito importante. Os antioxidantes são compostos que actuam inibindo e/ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes. De entre as inúmeras plantas com elevados níveis de antioxidantes destacam-se por exemplo os chás. Os chás são bebidas populares e fontes significativas de compostos fenólicos, sendo considerados importantes integrantes das dietas devido às suas propriedades antioxidantes (Sousa *et al.*, 2007). No entanto a maioria dos chás para além do efeito antioxidante apresentam aromas característicos e por vezes bem pronunciados, o que dificulta a sua utilização na indústria alimentar, quando se pretende apenas a função antioxidante. Assim, torna-se importante o estudo de plantas com actividade antioxidante e pouco/nada aromáticas.

O objectivo deste trabalho foi avaliar a eventual produção de extractos da espécie *Pterospartum tridentatum* L., de nome vulgar Carqueja, estudando-se a época de colheita mais adequada e o tempo de extracção com melhor rendimento, através da extracção em solução aquosa.

Os extractos foram caracterizados no que respeita ao teor em fenóis totais e actividade antioxidante. O estudo incidiu sobre plantas colhidas nas serras da Malcata e Gardunha em várias fases do ciclo vegetativo, designadamente, repouso vegetativo, floração e início de repouso.

## 2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

---

### 2.1 *PTEROSPARTUM TRIDENTATUM* (L.)

#### 2.1.1 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA

A *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. é uma leguminosa de nome comum Carqueja ou Carqueija que pertence à Divisão Spermatophyta, Subdivisão Magnoliophytina (*Angiospermae*) classe das *Magnoliopsida*, Subclasse *Rosidae* e Ordem *Fabales*. Pertence à família *Leguminosae*, Subfamília *Papilionoideae* e Género *Pterospartum* (Franco, 1971; Flora Ibérica; Talavera, 1999 citado por Grosso *et al.*, 2006). Esta espécie tem outras sinónimas, como *Chamaespartium tridentatum* (L.) P. Gibbs.; *Genistella tridentata* (L.) Samp. (Franco, 1971; Flora Ibérica; Grosso *et al.*, 2006).

A carqueja caracteriza-se como um arbusto perene, que pode atingir até 100 cm de altura, lenhoso e rígido (Figura 1). As suas raízes são aprumadas e bastante longas, por vezes, entrelaçam-se nas raízes do género *Pinus*, com o qual se encontra frequentemente associada na natureza (Ribeiro *et al.*, 2000).

Os caules são lenhosos, erectos ou prostrados com ramos alados lateralmente, formando falsas folhas de cor verde-escuro, recortadas e lenhosas. Os ramos são achatados com duas ou três expansões em forma de asa, com aspecto articulado, terminando com dois ou três dentes (Dias, 2005; Ribeiro *et al.*, 2000). As folhas, persistentes, alternas, unifolioladas e triangulares, aparentam ser tridentadas, pelos folíolos estarem unidos às estipulas (Dias, 2005).

As flores são de um amarelo intenso e dispõem-se em inflorescências corimbiformes, em grupos de 3 a 10, reunidas em ramalhetes curtos e apertados (Figura 2 e 3). Possuem pêlos nas sépalas que as revestem. O fruto é uma vagem oblongo-linear com 10 a 12 mm de comprimento. (Dias, 2005).



Figura 1 - Arbusto no seu *habitat* natural  
Início do repouso do ciclo vegetativo.



Figura 2 – Carqueja na fase de floração.



Figura 3 – Flores de *Pterospartum tridentatum*, carqueja

A fase de floração situa-se entre o mês de Abril em zonas de baixa altitude e de Maio a Julho nas terras com altitude mais elevada (Quer, 2000).

### 2.1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Este arbusto encontra-se a norte e centro da Península Ibérica, incluindo todo o território continental de Portugal sendo também frequente no Norte de África (Cardoso, 2005). A espécie *Pterospartum tridentatum* é bastante comum em Portugal e cresce espontaneamente. A carqueja é muito comum em zonas de grande altitude, designadamente na zona norte do país (Grosso *et al.*, 2006; Luís *et al.*, 2009).

A área portuguesa de zona protegida é de aproximadamente 3,3 milhões de hectares, o que representa 38% do território (Luís *et al.*, 2009).

O *habitat* para o crescimento desta espécie é a zona de matos, bosques, terrenos incultos e alguns de cultivo. Manifestam uma enorme preferência pelos povoamentos de *Pinus*. Apesar de se encontrar a baixas altitudes, a sua preferência recai sobre as zonas mais elevadas (Cardoso, 2005).

A espécie *Pterospartum tridentatum* L. em estudo neste trabalho foi recolhida em dois pontos geográficos distintos, sendo eles a Serra da Gardunha e Serra da Malcata (Figura 4).



*Figura 4 – Localização geográfica da Serra da Gardunha e Malcata.*

*Fonte:* Comissão Nacional Ambiente (1982) adaptado de Esteves, 2005.

A Serra da Gardunha encontra-se localizada na região centro de Portugal, no distrito de Castelo Branco, abrangendo os concelhos do Fundão e Castelo Branco. Com uma orientação NE-SO, tem aproximadamente 10.000 hectares, sendo a sua altitude máxima de 1227 metros (Esteves, 2005).

Apesar da forte intervenção humana que se verifica, a Serra da Gardunha mantém as suas potencialidades para a conservação da natureza uma vez que detém *habitats* e espécies de flora e fauna relevantes para a manutenção da biodiversidade (Adesgar, 1999; Esteves, 2005).

Segundo Afonso (2001), a Gardunha possui um grande número de espécies arbustivas, sendo as mais relevantes: *Chamaespartium tridentatum* (carqueja), *Pteridium aquilinum* (feto comum), *Halimium spp.* (sargaços), *Cistus spp.*, *Echinopartum lusitanicum* (caldoneira), *Genista falcata* e *G. triacanthus* (tojos) e, *Cytisus striatus*, *C. grandiflorus* e *C. multiflorus* (giestas), *Calluna vulgaris* (torga), *Erica australis* e *E. umbelata* (urzes), *Arbutus unedo* (medronheiro).

A Serra da Malcata é a décima sexta maior elevação de Portugal Continental situando-se na região entre a Beira Baixa e Beira Alta, entre os concelhos do Sabugal e de Penamacor.



A Reserva Natural da Serra da Malcata ocupa uma área de aproximadamente 2200 hectares sendo o seu ponto mais elevado de aproximadamente 1000 metros de altitude.

A paisagem é dominada por matos, variando a sua composição de acordo com a maior ou menor altitude, com a exposição ou a própria composição florística das formações em que se originaram. Nas zonas mais elevadas encontram-se giestas, carqueja, urzes, e medronheiros predominam os locais mais frios enquanto a esteva povoa as zonas mais secas (Rego *et al.*, 2003).

As espécies que podemos encontrar são: *Cistus ladanifer* (L.) (esteva), *Erica australis* L.; *Chamaespartium tridentatum* (L.) P. Gibbs (carqueja), *Halimium alyssoides* (Lam.), *Halimium ocymoides* (Lam.) Willk (Rego *et al.*, 2003).

Como espécies introduzidas existe o castanheiro na zona norte em áreas diminutas, o pinheiro bravo com uma representatividade apreciável nas zonas de baixa e média altitude, especialmente na zona norte da Reserva, com menor representatividade aparece o pinheiro negro, o vidoeiro e o eucalipto (RNSM/DSCN, 1993; Rego *et al.*, 2003).

Existem também pequenos olivais (*Olea europea* L. var. *europaea*), que estão a ser invadidos por matos, localizados onde o terreno é arável, junto às linhas de água, na parte meridional da Reserva (Rego *et al.*, 2003).

### **2.1.3 UTILIZAÇÃO A NÍVEL ALIMENTAR E NÃO ALIMENTAR**

Em Portugal a carqueja é colhida sobretudo na época da floração, na Primavera e não só é usada na “medicina” tradicional como também a nível gastronómico, por exemplo no arroz (arroz de carqueja), na carne assada e no guisado de coelho (Grosso *et al.*, 2006). Os caules da carqueja também são usados nos fornos a lenha, pois estes são altamente inflamáveis e conferem um aroma bastante agradável ao pão (Ribeiro *et al.*, 2000).

Segundo Grosso *et al.*, (2006) infusões das flores e dos terminais floridos da carqueja são recomendados para o tratamento de constipações, tosse, dores de cabeça e de estômago, para baixar a tensão arterial e para problemas de fígado. A carqueja tem propriedades diuréticas, depurativas, emolientes, laxantes, hipotensivas, hipoglicemiantes e digestivas.

Também Vitor *et al.*, (2004) referem que os ápices florais, normalmente secos, são muito usados na medicina popular, em infusões, para o tratamento de várias patologias, incluindo a diabetes. O estudo fitoquímico do extracto aquoso permitiu a identificação de isoflavonas e flavonóides como constituintes maioritários.

Ensaio de actividade biológica revelaram que o extracto aquoso da carqueja tem um efeito protector do endotélio face ao stress oxidativo, no entanto este mesmo extracto tem também um efeito hipoglicemiante dependente do tempo, possivelmente devido aos efeitos antagónicos de dois dos seus constituintes (Vitor, *et al.*, 2004).

Em termos de infusão são utilizadas as flores e/ou terminais floridos (30 g de flores, para um litro de água fervente), para uso no tratamento de gripes, bronquites, tosse, dores e inflamações da garganta (várias chávenas ao dia bem quentes com mel) (Dias, 2005; Ribeiro *et al.*, 2000).

A carqueja é uma fonte natural de compostos com actividade biológica, que deve ser totalmente caracterizado com o objectivo de sua valorização.

## 2.2 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que retardam o aparecimento de alteração oxidativa (Morais *et al.*, 2009). Do ponto de vista químico, os antioxidantes são compostos que contêm, no mínimo, um grupo hidroxilo, podendo ser sintéticos ou naturais (Ramalho *et al.*, 2005).

Na vertente alimentar e de acordo com o Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, Regulamento (CE) Nº 1333/2008, define-se antioxidante alimentar com a substância que prolonga o prazo de conservação dos géneros alimentícios, protegendo-os contra a deterioração causada pela oxidação, tal como a rancidez das gorduras e as alterações de cor.

Também no domínio da saúde se vem investigando os efeitos dos antioxidantes em relação a inúmeras doenças, principalmente nos países desenvolvidos do ocidente. Alguns estudos têm tentado explicar os benefícios dos antioxidantes (Morais *et al.*, 2009). Estas pesquisas debruçam-se sobre os efeitos e capacidade dos antioxidantes na prevenção de diversas doenças, designadamente em situações cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas (Harborne *et al.*, 2000; Sánchez-Moreno, *et al.*, 2002 citado por Silva *et al.*, 2010).

O chá é uma das bebidas mais consumidas e mais antigas do mundo, sendo na literatura referido como uma das melhores fontes de compostos fenólicos. Os primeiros relatos de seu uso datam do século 27 a.C., sendo considerado como uma das mais antigas bebidas produzidas por via biotecnológica e praticada pelo ser humano (Morais *et al.*, 2009).

Os chás têm atraído muita atenção nos últimos anos devido à sua capacidade antioxidante e sua abundância na dieta de milhares de pessoas em todo o mundo. São ricos em catequinas, flavonóides que apresentam propriedades biológicas como actividade antioxidante. Os chás ingeridos na forma de infusão contribuem para a extracção dos compostos fenólicos, considerados benéficos à saúde (Higdon & Frei, 2003, Mendel & Youdim, 2004, Bunkova *et al.*, 2005 citado por Moraes *et al.*, 2009).

Os condimentos são mundialmente utilizados para aumentar e/ou acrescentar sabor ao alimento, e, secundariamente, com finalidade de conservação, devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Vários estudos relatam a presença de antioxidantes em chás, mas a metodologia utiliza extractos obtidos por solventes orgânicos das folhas secas. Há poucos relatos sobre os compostos fenólicos e actividade antioxidante em infusões de plantas. Assim como os chás, várias espécies de condimentos demonstram interesse quanto à avaliação do potencial antioxidante devido seu uso comum na culinária (Morais *et al.*, 2009).

## **2.2.1 PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES**

### **2.2.1.1 SINTÉTICOS**

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria alimentar são o Butil-hidroxianisole (BHA), o Butil-hidroxi-tolueno (BHT), *terc*-Butil-hidroquinona (TBHQ) e o galato de propilo (PG) (Figura 5). A estrutura fenólica destes compostos permite a doação de um protão a um radical livre, regenerando assim a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Por sua vez, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres, radicais esses que podem estabilizar sem promover ou propagar reacções de oxidação (Ramalho *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2007).

O BHA é um antioxidante mais efectivo na oxidação em gorduras animais do que em óleos vegetais. Como a maior parte dos antioxidantes fenólicos, a sua eficiência é limitada em óleos insaturados de vegetais ou sementes. Apresenta pouca estabilidade quando submetido a elevadas temperaturas.

O BHT possui propriedades semelhantes ao antioxidante sintético descrito acima. Ambos podem conferir odor em alimentos quando aplicados a altas temperaturas por um longo período.

O TBHQ é solúvel em óleos e gorduras. É mais eficaz em óleos vegetais do que os dois antioxidantes referidos anteriormente. É considerado melhor antioxidante para óleos de fritura pois resiste a temperaturas elevadas.

O PG é um éster do 3,4,5 ácido triidroxibenzóico tem uma concentração óptima de actividade como antioxidante e quando usado em níveis elevados pode actuar como pró-oxidante (Bailey, 1996 citado por Ramalho *et al.*, 2005).

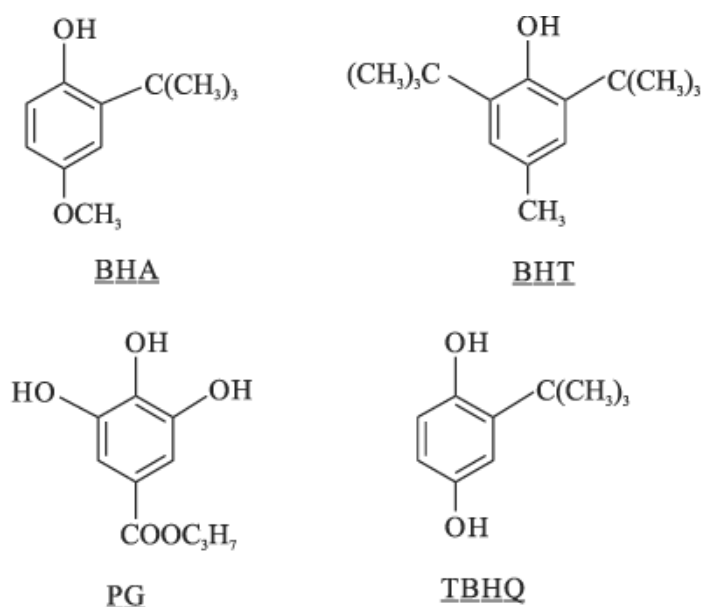


Figura 5 – Estrutura dos antioxidantes sintéticos, BHA, BHT, PG e TBHQ.

Fonte: Ramalho *et al.*, 2005.

Alguns estudos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes sintéticos apresentarem alguns efeitos tóxicos (Sousa *et al.*, 2007).

### 2.2.1.2 NATURAIS

Os antioxidantes naturais são moléculas presentes em plantas que, em pequenas quantidades, possuem a capacidade de interromper a formação de radicais livres. Desse modo, são capazes de reduzir a velocidade das reacções de oxidação dos compostos

lipídicos presentes em determinado produto ou impedir reacções de escurecimento (Ramalho *et al.*, 2005). Entre os antioxidantes naturais mais utilizados na indústria alimentar podem ser citados os tocoferóis, os compostos fenólicos e extractos de plantas

O tocoferol, por ser um dos melhores antioxidantes naturais é amplamente aplicado como meio para inibir a oxidação dos óleos e gorduras comestíveis, prevenindo a oxidação dos ácidos gordos insaturados. Os tocoferóis (vitamina E) estão presentes de forma natural na maioria dos óleos vegetais, em alguns tipos de pescado e actualmente são produzidos por síntese. Existem quatro tipos segundo a localização dos grupos metilo no anel:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . A actividade antioxidante dos tocoferóis é principalmente devida à capacidade de doar hidrogénio dos grupos fenólicos aos radicais livres interrompendo a propagação em cadeia (Ramalho *et al.*, 2005).

Os compostos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzénico, um grupo carboxilo e um ou mais grupos metoxilo na molécula, que conferem propriedades antioxidantes. São divididos em três grupos: ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos e cumarinas (Ramalho *et al.*, 2005). Os compostos fenólicos são metabolitos secundários das plantas e desempenham um papel importante na absorção e neutralização dos radicais livres.

Esses compostos agem como antioxidantes, não somente pela sua forte capacidade em doar hidrogénio ou electrões, mas também devido ao facto de os radicais intermédios impedirem a oxidação de vários constituintes do alimento (Silva *et al.*, 2010).

Diversos autores realizaram estudos para verificar o potencial antioxidante dos ácidos fenólicos, com o objectivo de substituir os antioxidantes sintéticos, largamente utilizados na conservação de alimentos lipídicos por aumentarem a vida útil de muitos produtos (Ramalho *et al.*, 2005).

O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, também denominados de substâncias reactivas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o stress oxidativo (Morais *et al.*, 2009).

Os carotenoídes, outra categoria importante de antioxidantes naturais, são constituídos por cadeias de polienos, num sistema de duplas ligações conjugadas, responsáveis pela actividade antioxidante desses compostos, tanto na absorção de oxigénio como de radicais livres, para interromper as reacções em cadeia onde eles estão envolvidos (Silva *et al.*, 2010).

Os extractos de plantas aromáticas e chás estão entre as principais fontes de antioxidantes naturais estudadas, no entanto grande parte dos trabalhos desenvolvidos ainda não se encontram explorados (Sousa *et al.*, 2007).

As plantas aromáticas e medicinais (PAM) são importantes alvos na busca de antioxidantes naturais do ponto de vista da segurança alimentar (Sousa *et al.*, 2007). O homem tem usado estes produtos desde tempos longínquos não somente para aromatizar os alimentos mas também devido às suas propriedades anti-sépticas e medicinais (Luís *et al.*, 2009). Foram realizados alguns estudos com plantas aromáticas, especiarias e chás nos quais se verificou uma actividade antioxidante relevante, e se demonstrou interesse não só na informação sobre a composição química como dos mecanismos envolvidos.

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como o cancro, doenças cardiovasculares, cataratas, declínio do sistema imunitário e disfunções cerebrais (Sousa *et al.*, 2007).

### **2.2.2 PRINCIPAIS UTILIZAÇÕES**

A oxidação lipídica é inibida por sequestradores de radicais livres. Em termos alimentares, a deterioração de óleos e gorduras é responsável pelos odores e sabores rançosos, com consequente decréscimo da qualidade e segurança nutricional, causado pela formação de produtos secundários, potencialmente tóxicos. Assim, a adição de antioxidantes é requerida para preservar sabor e odor, além de evitar a destruição de vitaminas. Tal como referido anteriormente entre os antioxidantes sintéticos mais utilizados para preservar alimentos, constam o BHA, BHT, GP e TBHQ e os sorbatos. (Sousa *et al.*, 2007). Para minimizar oxidações relacionadas com a preservação da cor é muito utilizado o ácido ascórbico ou respectivos ésteres.

Alguns estudos têm demonstrado a possibilidade deste antioxidantes sintéticos apresentarem alguns efeitos tóxicos. O galato de propila (GP), por exemplo, quando em presença de peróxido de hidrogénio reage com iões ferrosos formando espécies reactivas de oxigénio, as quais posteriormente podem atacar alvos biológicos. (Sousa *et al.*, 2007).

A substituição de antioxidantes sintéticos por naturais pode apresentar vantagens devido a implicações na área de saúde e na funcionalidade. Nota-se, por exemplo, que a

maior solubilidade dos antioxidantes naturais tanto em água como em óleo é útil na preparação de emulsões e outras formulações, como os hidrogéis (Ramalho *et al.*, 2005).

Na utilização de antioxidantes naturais, há vantagem também no nível da sustentabilidade, na medida em que as indústrias alimentares produzem resíduos que poderiam ter um destino muito mais benéfico, favorecendo o homem e o meio ambiente. Por exemplo, muitos frutos comestíveis são processados para produção de sumos naturais, sumos concentrados, doces, polpas e extractos. Esses frutos possuem sementes e cascas, fontes naturais de antioxidantes, que são muitas vezes rejeitadas em vez de serem utilizadas, evitando o desperdício de alimentos (Oliveira *et al.*, 2009).

O grande interesse na substituição de antioxidantes alimentares sintéticos por naturais despertou intensa procura por materiais vegetais brutos para a identificação de novos antioxidantes. Por outro lado, as reacções de oxidação não são de interesse exclusivo das indústrias alimentares, na medida em que influenciam a produção de outros bens oxidáveis, como cosméticos, produtos farmacêuticos e plásticos, entre outros (Oliveira *et al.*, 2009).

Assim, a procura de antioxidantes naturais é importante para as indústrias como a alimentar, farmacêutica, cosmética e perfumaria. Nestas indústrias, há um grande interesse pelo estudo da oxidação lipídica, em virtude, da deterioração que este tipo de dano oxidativo pode causar (rancificação, perda de aromas e formação de *off-flavors*, rejeição do consumidor) (Sousa *et al.*, 2007) bem como outros tipos de fenómenos oxidativos com implicações negativas a nível da cor.

### **2.2.3 MÉTODOS DE EXTRACÇÃO DE ANTIOXIDANTES E DETERMINAÇÃO DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

A eficiência antioxidante de compostos bioactivos depende de sua estrutura e da sua concentração no meio. O teor destas substâncias em vegetais é amplamente influenciado por factores genéticos e condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta, entre outros aspectos. É de notar, ainda, que a nível analítico a capacidade antioxidante é influenciada pelo substrato utilizado no ensaio, pelo solvente e pela técnica de extracção, bem como pelo binómio tempo/temperatura. Em termos de solventes orgânicos, o metanol, tem sido apontado como o mais eficiente no que se refere à capacidade de conseguir extrair elevada quantidade de compostos bioactivos para este caso específico (Oliveira *et al.*, 2009).

O método 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) é amplamente usado para avaliar a capacidade antioxidante de extractos de plantas a partir de diferentes materiais (Scherer *et al.*, 2009). O efeito dos antioxidantes em presença do DPPH foi concedido devido à sua capacidade de doação de hidrogénio (Luís *et al.*, 2009).

Segundo Scherer *et al.*, (2009) um dos métodos mais usados para verificar a capacidade antioxidante consiste em avaliar a actividade do DPPH de coloração púrpura, que absorve no comprimento de onda de 517 nm. Por acção de um antioxidante o DPPH é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) de coloração amarela, com consequente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorizada pelo decréscimo da absorvância. A partir dos resultados obtidos, determina-se a percentagem de actividade antioxidante (quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante).



### 3. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

Face ao objectivo deste estudo, **avaliação da influência do local e época de colheita no rendimento e características de extractos de Carqueja**, o trabalho incidiu sobre:

- Estudo de dois locais de produção da planta: serras da Malcata e Gardunha;
- Estudo de diferentes fases do ciclo vegetativo: repouso vegetativo, floração e início de repouso;
- Estudo de diferentes tempos de extracção;
- Caracterização dos extractos no que respeita: rendimento total de extracção, teor de fenóis totais e actividade antioxidante.

#### 3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

##### 3.1.1 MATERIAL VEGETAL

A colheita das plantas *Pterospartum tridentatum* L. foi realizada no ano de 2010 tendo sido efectuada nas três fases do ciclo vegetativo: repouso vegetativo, floração e início do repouso, no período de Fevereiro a Outubro, na zona da Beira Baixa e Beira Alta (zona centro de Portugal) (Quadro 1). A planta foi identificada e devidamente conservada, no Laboratório Ferreira Lapa do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

*Quadro 1* - Identificação do material vegetal em estudo, fases do ciclo vegetativo, mês/ano de colheita e localização geográfica.

FASES DO CICLO VEGETATIVO	MÊS/ANO DE COLHEITA	LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA
Repouso vegetativo – <i>Caules</i>	Fevereiro / 2010	Serra da Malcata Serra da Gardunha
Floração – <i>Caules</i>	Maio / 2010	
Floração – <i>Flores</i>	Maio / 2010	
Início de repouso – <i>Caules</i>	Outubro /2010	

Os locais de colheita do material vegetal são caracterizados no Quadro 2. Os locais onde foram realizados as colheitas estão identificados no mapa, (Figura 6).

Quadro 2 – Coordenadas e altitude dos locais de colheita da espécie *P. tridentatum* L.

LOCAIS DE COLHEITA	COORDENADAS	ALTITUDE (m)
<b>Malcata</b>	40°06'27.822N 7°28'52.241W	916
<b>Gardunha</b>	40°14'05.942N 7°06'52.804W	743

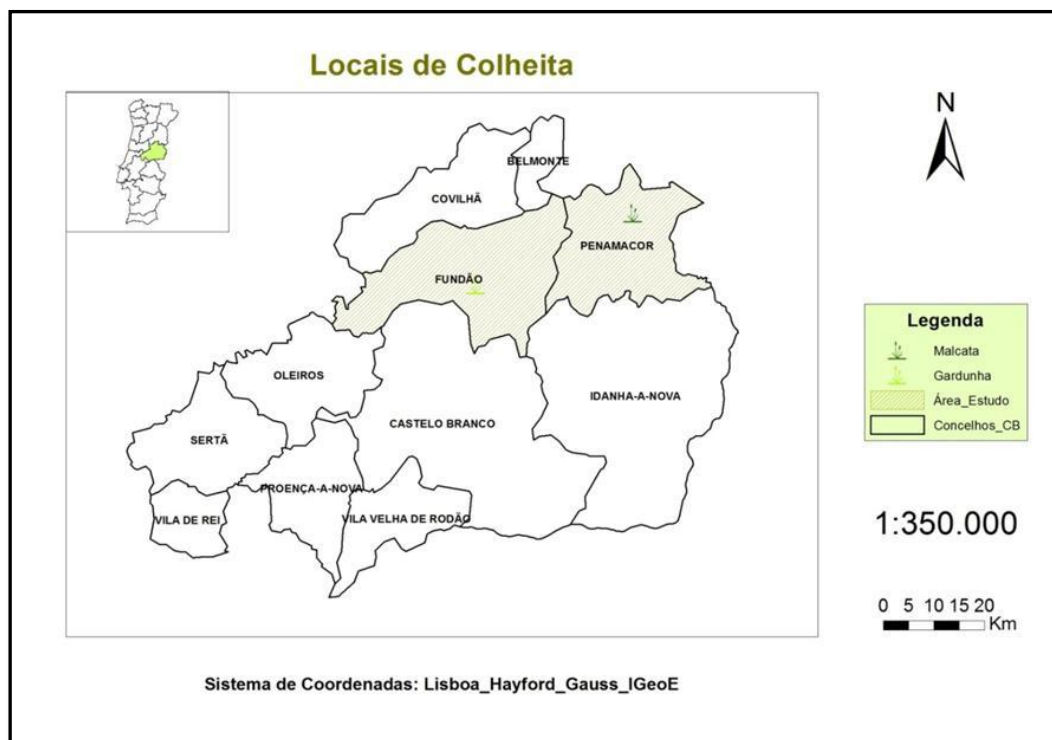


Figura 6 - Mapa com locais de colheita de amostras de *Pterospartum tridentatum* L.

### 3.1.2 MÉTODOS

#### 3.1.2.1 OBTENÇÃO DE EXTRACTOS

Efectuou-se uma extracção aquosa de *P. tridentatum* (figura 7) utilizando um equipamento de Clevenger para garantir o nível de solvente ao longo de todo o período de extracção e para permitir recolher uma eventual componente aromática. A extracção de 25 g de material vegetal em 100 mL de água destilada foi realizada à temperatura de 100°C (figura 8). Tendo por objectivo estudar o rendimento de extracção em função do tempo, foram testados os seguintes tempos: 15, 30 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. No final de cada tempo de extracção a parte líquida foi retirada e liofilizada. Sobre o mesmo material vegetal foram efectuadas extracções sucessivas, sempre com uma nova água de extracção.



Figura 7 – Aparelho de Clevenger modificado.



Figura 8 – Extracção das flores da carqueja.

As diferentes soluções aquosas obtidas nos processos de extracção foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas e posteriormente introduzidas no liofilizador (Telstar lyoquest, Telstar Espanha). A liofilização processou-se a uma pressão de 0,1 mbar e uma temperatura entre  $-45^{\circ}\text{C}$  e  $-50^{\circ}\text{C}$  durante 24 a 36 horas, tempo ao fim do qual as amostras se apresentavam completamente liofilizadas (Figura 9). Os extractos liofilizados foram conservados em excicador, ao abrigo da luz. O rendimento de extracção foi calculado através da equação:



Figura 9 – Liofilizador utilizado.

### 3.1.2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRACTOS

#### 3.1.2.2.1 DETERMINAÇÃO DA HUMIDADE

A determinação da humidade foi efectuada por gravimetria, por secagem das amostras até massa constante. Foram pesados cadinhos ( $P_1$ ) e adicionou-se a amostra em estudo ( $P_2$ ), sendo esta de 0,25g.

Para determinação do peso final (*equação 1*) colocaram-se os mesmos cadinhos na estufa a 100°C durante 3 horas e voltou-se a pesar ( $P_3$ ) após arrefecimento num excicador até peso constante.

$$\text{Peso}_{\text{final}} = P_1 - P_3 \quad (\text{Eq. 1})$$

A determinação da percentagem de humidade da amostra é calculada de acordo com a *equação 2*. Os ensaios foram efectuados em triplicado.

$$\text{Humidade} = \frac{P_2 - P_3}{P_2} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

#### 3.1.2.2.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS

A quantificação espectométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas. No presente estudo, os teores de fenóis totais dos extractos foram determinados através do método Ribéreau-Gayon.

Para a determinação do teor de fenóis foi pesado 3,5 mg de extracto sólido liofilizado para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada e homogeneizou-se. Este procedimento foi efectuado na ausência de luz.

Procedeu-se de seguida às leituras da absorvância no comprimento de onda de 280 nm ( $\text{Abs}_{280 \text{ nm}}$ ). Estas monitorizações foram efectuadas no espectrofotómetro (Spetra 1.5 Release 1.1). Os valores dos compostos fenólicos totais foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de matéria seca. As amostras foram realizadas em duplicado. Os cálculos foram realizados com base na curva de calibração (figura 10).

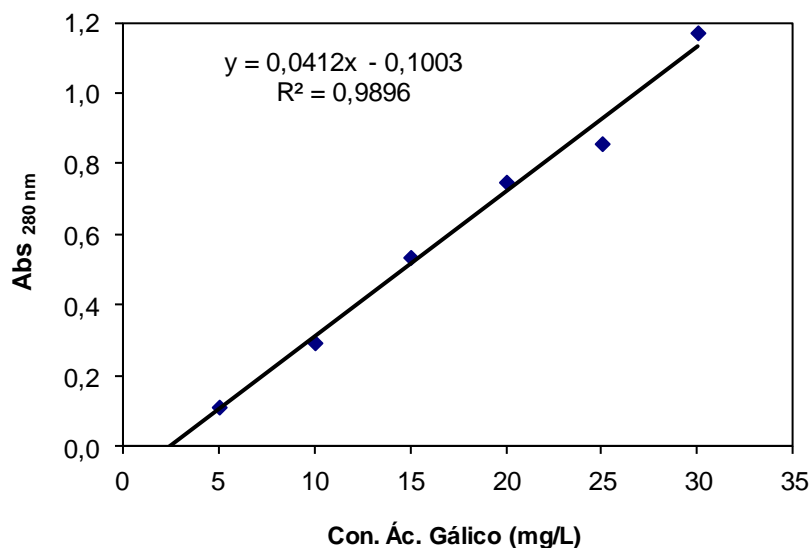


Figura 10 - Curva de calibração para a determinação de teor de fenóis.

### 3.1.2.2.3 DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

A actividade antioxidante dos diferentes extractos foi determinada através da sequestração de radicais (DPPH) descrito por Scherer *et al.*, (2009).

#### Preparação da solução-mãe e solução diária de DPPH:

Foi preparada uma solução-mãe de DPPH (Sigma-Aldrich) num balão volumétrico de 100 mL em metanol (Panreac) contendo 24 mg de DPPH. Esta solução foi preparada sob agitação magnética e ao abrigo da luz através protecção do balão com papel de alumínio. Esta solução foi preparada, pelo menos, 2 horas antes da medição e armazenada durante um máximo de 5 dias a 4°C.

Para a preparação da solução diária foram pipetados 9 mL da solução-mãe, previamente preparada, e adicionados 36mL de metanol. A absorvância desta solução foi lida num espectrofotómetro (GBC UV/VIS 916) a 517 nm, tendo sido utilizado como branco o Metanol. A absorvância lida no comprimento de onda acima mencionado não deve ultrapassar o valor de 1,1.

### Preparação da amostra e leitura da actividade antioxidante

Para a leitura da actividade antioxidante das amostras foram pesados 0,2 mg de extracto liofilizado de cada amostra e adicionado 1 mL de água. Após homogeneizar foi adicionado 4 mL de solução diária de DPPH e permaneceu durante 40 minutos no escuro à temperatura ambiente.

Procedeu-se às leituras da absorvância no comprimento de onda de 517 nm ( $Abs_{517\text{ nm}}$ ). Os ensaios foram realizados em triplicado. Os cálculos foram realizados com base na curva de calibração (Figura 11).

A percentagem de RSA (radical scavenging activity) foi determinada de acordo com a equação,

Onde:  $Abs_{\text{control}}$  é a absorvância de DPPH em metanol

$Abs_{\text{amostra}}$  é a absorvância de DPPH na amostra de extracto

Os resultados apresentam-se expressos em equivalentes de Trolox por 100 g de matéria seca (mMtrolox/100g m.s).

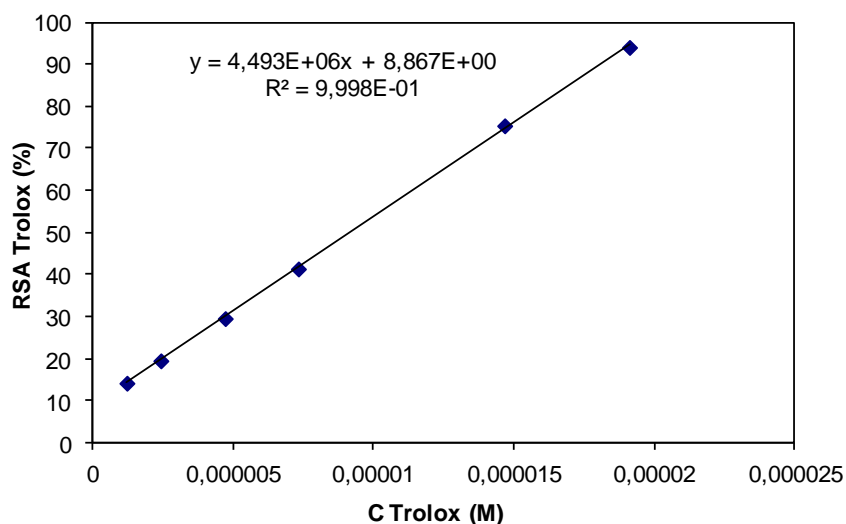


Figura 11 - Curva de calibração para a determinação de actividade antioxidante.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RENDIMENTO DE EXTRACÇÃO EM FUNÇÃO DA FASE DO CICLO VEGETATIVO E DO TEMPO DE EXTRACÇÃO

Para as três fases do ciclo vegetativo e os dois locais de colheita estudados foi avaliado o rendimento de extracção em tempos consecutivos até perfazer 180 minutos. As curvas cumulativas de extracção para as plantas colhidas nas serras da Malcata e da Gardunha são apresentadas nas figuras 12 e 13 respectivamente.

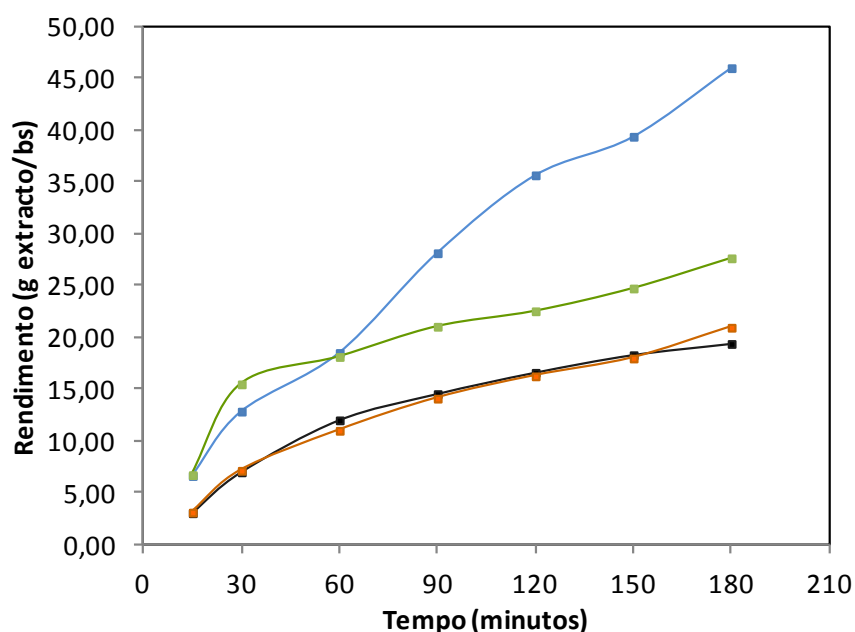


Figura 12 - Curva cumulativa do rendimento de extracção de *P. tridentatum*, colhido na serra da **Malcata**, nas várias fases do ciclo vegetativo ( —■— *Repouso vegetativo - caules*; —■— *Floração - caules*; —■— *Floração - flores*; —■— *Início do Repouso - caules*).

De acordo com a figura 12, amostra Malcata, verificou-se que existe um aumento do rendimento de extracção ao longo do tempo para qualquer uma das fases do ciclo vegetativo. É de notar que na fase de repouso vegetativo o rendimento é bastante superior, apresentando valores de 46,04 % m/m (m.s.). Nas flores, o rendimento atingiu um valor de 28,65 % m/m (m.s.).

Os caules na floração e no início do repouso apresentam valores de rendimento inferiores às outras fases, no entanto ostenta ser um valor considerável em termos de rendimento. Este valor pode ter como explicação o facto de ser no início do repouso que se dá a acumulação de reservas, uma vez que no período anterior ocorre um investimento da planta na sua frutificação e produção de sementes.

O clima e muitos factores podem ser condicionantes no que se refere ao rendimento. A zona da serra da Malcata apresenta um clima mais agreste no que se refere às amplitudes térmicas e vento. Possivelmente nestas condições de stress as plantas poderão sintetizar outros compostos.

Na figura 13 apresentam-se as curvas cumulativas do rendimento dos extractos em estudo neste caso na amostra da Gardunha. Verifica-se que em termos de rendimento em qualquer uma das fases esse rendimento situa-se entre os valores 17,16 e 25,60% m/m (m.s.).

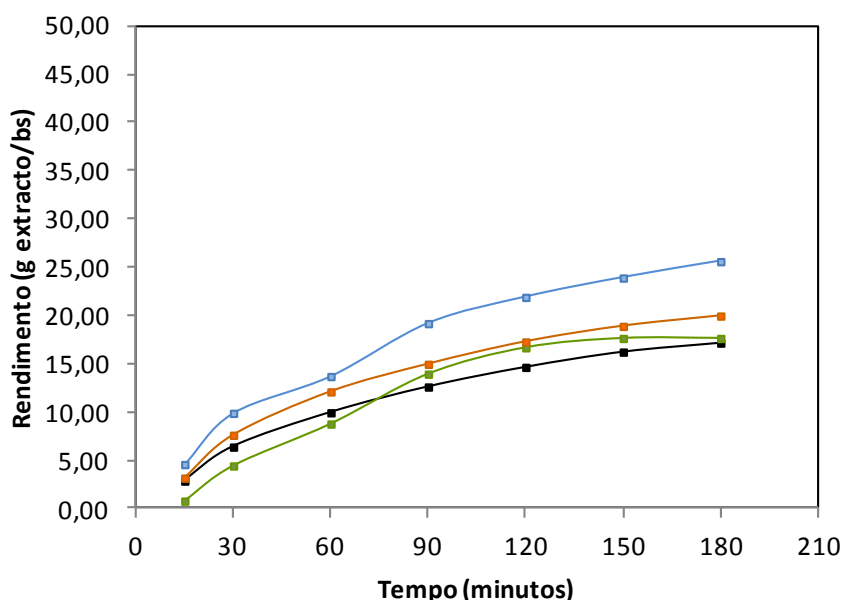


Figura 13 - Curva cumulativa do rendimento de extração de *P. tridentatum*, colhido na serra da **Gardunha**, nas várias fases do ciclo vegetativo ( — Repouso vegetativo - caules; — Floração - caules; — Floração - flores; — Início do Repouso - caules).

Nesta amostra a fase de repouso vegetativo também apresenta o maior rendimento em relação às outras fases, atingindo-se um valor de 25,60 % de m/m (m.s.). As três outras curvas cumulativas apresentam valores bastantes semelhantes, entre 17,20 e 20,0 g de extracto/ 100g (m.s.).



Com o objectivo de poder comparar o rendimento de extracção nas plantas colhidas nos dois pontos apresentam-se as curvas cumulativas de extracção para plantas colhidas na mesma fase do ciclo vegetativo nos dois locais em estudo (Figura 14). O estudo comparativo do rendimento de extracção nas várias fases do ciclo vegetativo e nos dois locais de colheita permite concluir que na maioria dos casos a carqueja da serra da Malcata apresenta maior rendimento de extracção.

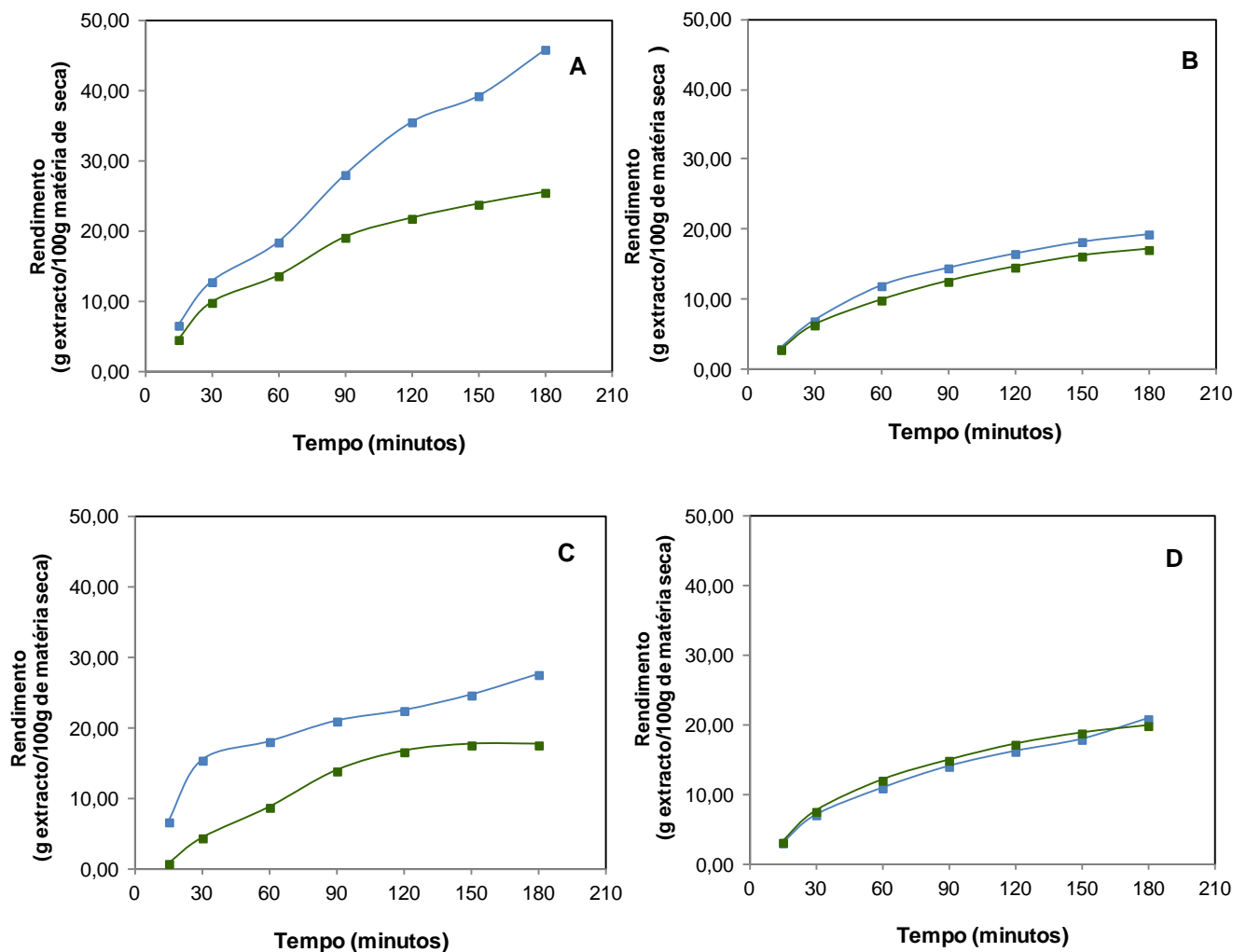


Figura 14 - Curvas cumulativas do rendimento de extracção de *P. tridentatum*. **A** – Repouso vegetativo - caules; **B** – Floração - caule; **C** – Floração - flores; **D** – Início do repouso – caules (—■— Serra da Malcata; —■— Serra da Gardunha).

Verificou-se que na fase de repouso vegetativo, Figura 14 A, o rendimento na amostra da Malcata é bastante superior ao da amostra da Gardunha, apresentando um aumento contínuo até os 180 minutos. Por sua vez na amostra da Gardunha verifica-se que a partir dos 150 minutos a curva tende para um patamar.

Na fase de floração, quando foram utilizados apenas caules (Figura 14 **B**) e na fase de início do repouso (Figura 14 **D**) verifica-se a existência de um patamar a partir dos 90 minutos, sendo o rendimento ao longo do tempo bastante semelhante para as duas amostras em estudo.

Na figura 14 (**C**), no qual se estudaram as flores na floração pode constatar-se que na Malcata o rendimento é superior ao longo do tempo em relação à Gardunha.

A análise conjunta dos resultados permite concluir que em termos de rendimento de extracção o material vegetal colhido nos dois locais apresenta valores elevados, sendo que o da serra da Malcata apresenta valores superiores. De salientar que em nenhuma das situações se atingiu um verdadeiro patamar pelo que se conclui que o material vegetal ainda continha materiais extractáveis mesmo ao fim de 180 minutos. No entanto e dado que a extracção é efectuada à temperatura de ebulição, o que implica elevados consumos energéticos, tempos tão elevados de extracção serão de evitar.

No sentido de perceber qual o tempo de extracção mais conveniente avaliou-se a massa de extracto recuperado em termos de percentagem do total obtido, ao longo do tempo de extracção estudado (Quadro 3).

Quadro 3 – Massa de extracto recuperado (%) em função do tempo de extracção das amostras Malcata e Gardunha.

Tempo (minutos)	Amostra Malcata				Amostra Gardunha			
	Massa de extracto recuperado (%) *				Massa de extracto recuperado (%) *			
	Repouso vegetativo	Floração		Início do repouso	Repouso vegetativo	Floração		Início do repouso
		Caules	Flores			Caules	Flores	
<b>15</b>	14,37	15,57	24,23	14,70	17,87	16,70	4,47	15,89
<b>30</b>	27,89	35,96	55,95	33,98	38,60	37,21	25,11	38,13
<b>60</b>	40,20	61,89	65,52	52,44	53,50	57,94	49,74	60,65
<b>90</b>	61,14	75,00	76,09	67,27	74,92	73,48	79,04	74,97
<b>120</b>	<b>77,49</b>	<b>85,61</b>	<b>81,50</b>	<b>77,56</b>	<b>85,54</b>	<b>85,35</b>	<b>83,49</b>	<b>86,56</b>
<b>150</b>	85,60	94,40	89,46	85,79	93,37	94,56	88,34	94,66
<b>180</b>	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

\*Em relação à massa de extracto recuperada em 180 minutos.

Pela comparação dos valores calculados em relação ao rendimento cumulativo, verifica-se que a massa de extracto recuperado em percentagem aos 60 minutos, quer nas amostras da Malcata quer nas da Gardunha se situa entre os 40 e os 60%. Por sua vez, aos 90

minutos apresenta valores superiores a 60%. Aos 120 minutos, quer na amostra da Malcata quer na da Gardunha a percentagem situa-se acima de 75% enquanto aos 150 minutos essa mesma percentagem aumenta 10% passando a ser de 85%.

A massa de extracto recuperada foi em média superior a 75% aos 120 minutos, o qual apresenta ser um valor aceitável, tendo em conta o tempo de extracção e os custos energéticos inerentes. O acréscimo de mais uma hora de tempo de extracção na maioria dos casos conduziu a um acréscimo de rendimento pouco evidente, pelo que se conclui que o tempo de extracção de 2 horas poderá ser o mais indicado, quando se atende apenas ao rendimento de extracção.

Em relação a outros estudos, o rendimento de extracção em qualquer das fases do ciclo vegetativo foi sempre superior comparativamente a outras espécies vegetais (Luís *et al.*, 2009; Sousa, *et al.*, 2007).

De acordo com os resultados obtidos por Luís *et al.*, (2009) verifica-se que os valores do rendimento em extractos aquosos de *Erica spp.* e *Cytisus scoparius* são de 4,64 e 4,98% m/m (m.s.) respectivamente. Por sua vez, em extractos em solução de etanol o rendimento aumentou para o valor de 11,64% m/m (m.s.) para o caso de *Erica spp.* e 11,76% m/m (m.s.) para a *C. scoparius*. No mesmo estudo o rendimento com o extracto de *P. tridentatum* continua a ser superior, 28,61% m/m (m.s.) quer em solução de etanol quer em solução aquosa, 12,01 61% m/m (m.s.).

Pela comparação dos resultados obtidos com dados da literatura verifica-se que os extractos estudados apresentam um rendimento semelhante aos resultados obtidos por Luis, *et al.*, (2009) no seu estudo. No entanto, o rendimento na amostra da Malcata apresenta ser superior.

Num outro estudo realizado noutras plantas, designadamente na espécie *Carissa opaca* (fruto medicinal utilizada no Paquistão) obteve-se um rendimento de extracção de 10,7±0,99% m/m (m.s.) (Sahreen *et al.*, 2010).

Sousa *et al.*, (2007) também estudou o rendimento de extracção de algumas plantas medicinais, no entanto este estudo foi efectuado com extracto etanólico. Os resultados obtidos foram *C. prunifera* (raiz) 4,6%, *T. brasiliensis* folha 5,8% e casca 6,0%, *Q. grandiflora* (folha) 9,8%, *C. macrophyllum* (folha) 13,7% e *T. fagifolia* (folha) 22,0%.

## 4.2 TEOR DE FENÓIS TOTAIS

Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais (FT) pelo método Ribéreau-Gayon, expressos em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de matéria seca (m.s.) estão apresentados na figura 15 para os extractos aquosos de carqueja da amostra da Malcata.

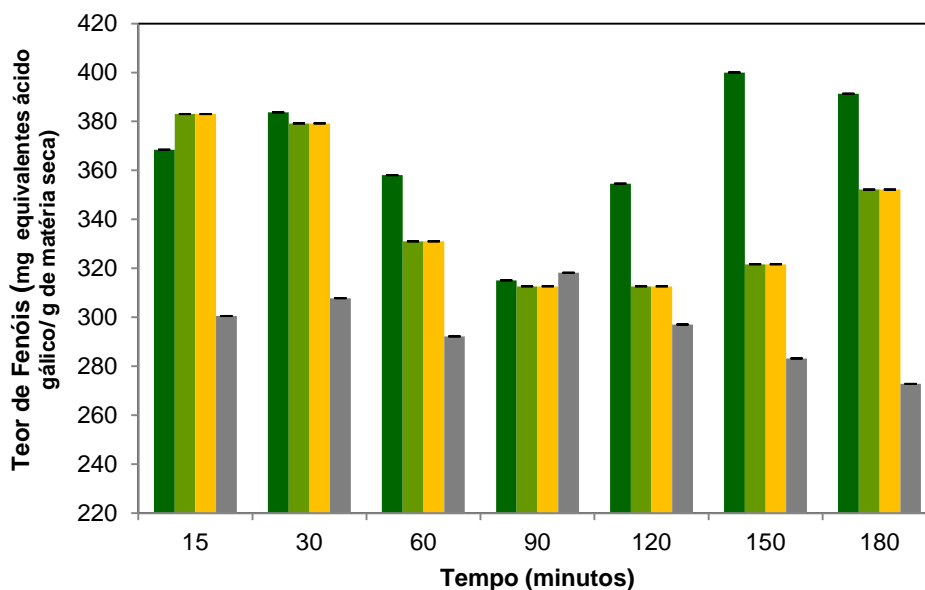


Figura 15 – Teor de fenóis totais no extracto aquoso de carqueja, amostra Malcata. (■ *Repouso vegetativo - caules*; ■ *Floração - caules*; ■ *Floração - flores*; ■ *Início do repouso - caules*). As medições foram feitas em duplicado (desvio padrão  $\leq 0,08$ ).

Pela análise da figura 15 é possível verificar que o teor de fenóis dos extractos de carqueja da Malcata varia entre 273 e 400 mg EAG/g (m.s.).

De acordo, com os valores obtidos pode-se observar que a fase do repouso vegetativo é aquela onde o teor de fenóis é mais elevado para todos os extractos obtidos nos diferentes tempos de extracção. Por sua vez, no início do repouso é quando se obtém uma menor quantidade destes compostos. Na floração verifica-se que o teor é muito semelhante, quer nas amostras onde foram utilizados caules quer nas que se utilizaram apenas flores.

É de notar que aos 90 minutos o teor de fenóis apresenta valores semelhantes em todas as fases do ciclo vegetativo. A média do teor de fenóis é de 315 mg EAG ácido /g (m.s.). Pode afirmar-se que ao longo do tempo de extracção a quantidade de teor de fenóis não diminui existindo sempre um teor considerável, acima de 273 mg EAG/g (m.s.).

Na amostra da Gardunha, observa-se que os valores do FT em soluções aquosas variaram entre 245 e 394 mg EAG/g (m.s.) (figura 16). Estes valores são ligeiramente inferiores aos observados nas amostras da Malcata.

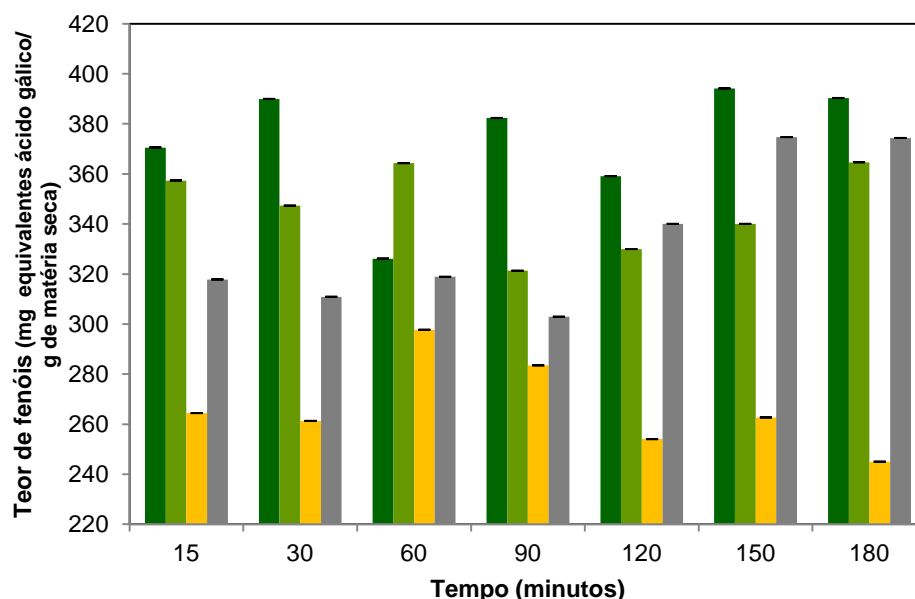


Figura 16 – Teor de fenóis totais no extracto aquoso de carqueja, amostra Gardunha. (■ Repouso vegetativo - caules; ■ Floração - caules; ■ Floração - flores; ■ Início do repouso - caules). As medições foram feitas em duplicado (desvio padrão  $\leq 0,07$ ).

Em termos de fase do ciclo vegetativo a que apresenta um maior teor de fenóis para todos os tempos de extracção, é a do repouso vegetativo, sendo o valor médio de teor de fenóis de 373 mg EAG/g (m.s). Por sua vez, na fase de floração os caules da carqueja apresentam um teor de fenóis igualmente elevado, ente 321 e 365 mg EAG/g (m.s) sendo que as flores apresentam valores inferiores.

Pode considerar-se que ao longo do tempo de extracção, entre os 15 e os 180 minutos, o teor de fenóis se mantém constante para cada uma das fases do ciclo vegetativo, afirmando-se que não existirá perda destes compostos ao longo do tempo de extracção.

Podemos considerar que todos os extractos avaliados apresentam altos teores de compostos fenólicos, quando comparados a dados de outras espécies descritos por Sousa *et al.*, (2007). O teor de fenóis presente na espécie *Pterospartum tridentatum* mostra níveis elevados em qualquer um dos momentos da fase do ciclo vegetativo, sendo superiores a outras espécies previamente estudadas, como *Harpephyllum caffrum* e na espécie *Sclerocarya birrea* (Ajila *et al.*, 2010). Estes mesmos resultados quando comparados com estudos realizados noutras plantas, designadamente, na espécie *Carissa opaca* (58,4 $\pm$ 34 mg EAG/g) também se apresentam mais elevados (Saheer *et al.*, 2010).

No estudo semelhante realizado por Luís *et al.*, (2009) com extractos aquosos de *Erica* spp., *Pterospartum tridentatum* e *Cytisus scopariu* verificou-se que o teor de fenóis é de 212,73  $\pm$ 1,64, 222,60 $\pm$ 5,12; e de 134,67  $\pm$ 0,14 mg EAG/g (m.s.) respectivamente (m.s.).

Sousa *et al.*, (2007) realizaram um estudo semelhante com cinco plantas medicinais: *Terminalia brasiliensis*, *Terminalia fagifolia*, *Cenostigma macrophyllum*, *Qualea grandiflora*, *Copernicia prunifera* e obtiveram resultados de teor de fenóis que variam entre 11,55 mg EAG/g (m.s.) no extracto da raíz *C. prunifera* e 97,6 mg EAG/g (m.s.) no extracto da folha de *T. fagifolia*.

Um outro estudo realizado por Rockenboch *et al.*, (2008) no qual obteve valores do teor de compostos fenólicos em extracto aquosos da fruta *Physalis peruviana* foi de 47,8 mg EAG/g matéria fresca (m.f.). No mesmo estudo, foram observados teores de fenólicos totais superiores em graviola e uva, respectivamente, de 84,3 e 117,1 mg EAG/ g (m.f.). Sun *et al.*, (2002) encontraram em frutas como uva teores de fenóis de 182,0 mg EAG/g (m.f.) e em morangos um valor de 147,8 mg EAG/g (m.f.).

Pelo exposto pode concluir-se que a espécie *P. tridentatum* em estudo apresenta um teor fenólico muito elevado e que deverá ser objecto de uma caracterização exaustiva.

### 4.3 ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

Na figura 17 encontram-se os dados obtidos do estudo de actividade antioxidante (AA) para a amostra da Malcata nas várias fases do ciclo vegetativo.

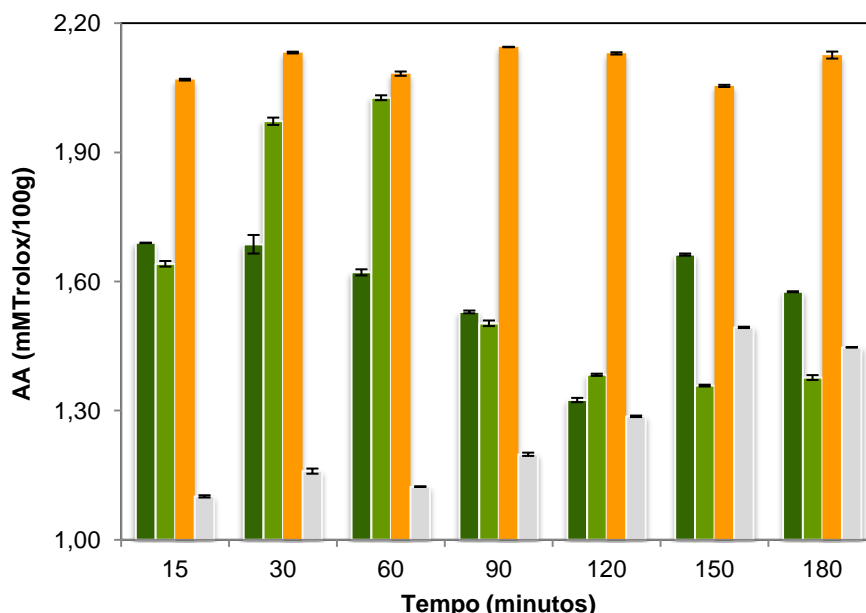


Figura 17 – Actividade antioxidante no extracto aquoso de carqueja, amostra Malcata. (■ *Repouso vegetativo - caules*; ■ *Floração - caules*; ■ *Floração - flores*; ■ *Início do repouso - caules*). As medições foram feitas em triplicado (desvio padrão  $\leq 0,02$ ).

Como se pode observar os resultados variam em função da fase do ciclo vegetativo, no entanto verifica-se que na fase de floração, designadamente nos extractos que contém apenas as flores, a actividade antioxidante (mMTrolox/100g) é maior que nas outras fases. Pela observação conjunta dos vários valores pode constatar-se que todas as fases do ciclo vegetativo apresentam uma AA superior a 1,01 mM Trolox/ 100g sendo o seu máximo de 2,10 mM Trolox/ 100g. Conclui-se que existe sempre actividade em qualquer dos extractos estudados.

As amostras da Gardunha (Figura 18) apresentam valores de actividade antioxidante semelhantes aos valores observados para as amostras da Malcata, não existindo portanto uma grande diferença entre locais de colheita.

Verificou-se que na fase de floração, estudo apenas com as flores, apresenta o maior valor para AA, sendo o valor médio de 2,08 mM Trolox/100g. A menor AA observa-se no início do repouso. A observação conjunta dos resultados permite concluir que qualquer uma das fases do ciclo vegetativo apresenta AA superior a 1,38 mM Trolox/ 100g sendo o seu máximo de 2,08 mM Trolox/ 100g.

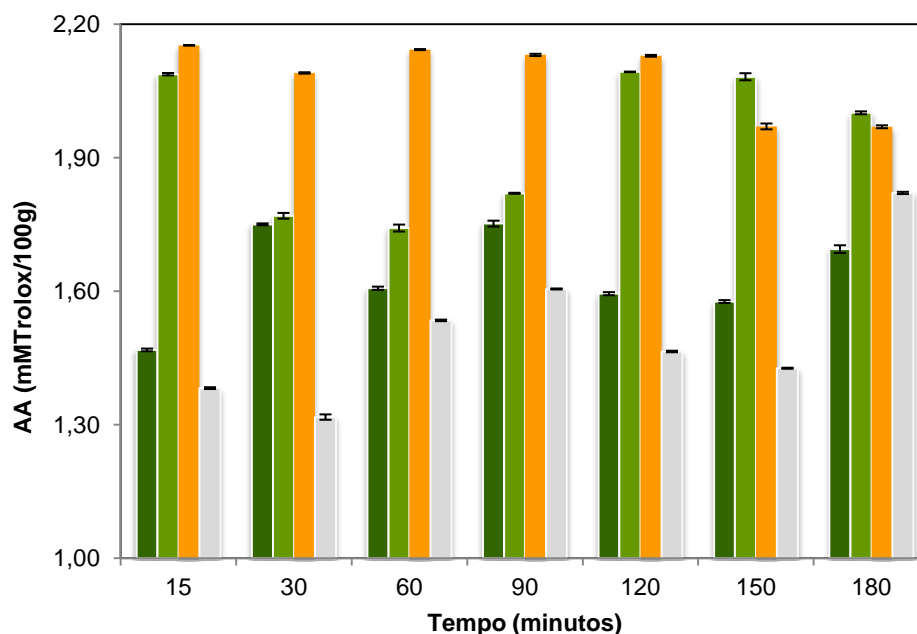


Figura 18 – Actividade antioxidante no extracto aquoso de carqueja, amostra Gardunha. (■ Repouso vegetativo - caules; ■ Floração - caules; ■ Floração - flores; ■ Início do repouso - caules). As medições foram feitas em triplicado (desvio padrão  $\leq 0,01$ ).

Na figura 19 apresentam-se os resultados referentes à AA dos extractos das flores para as duas populações estudadas. Verifica-se que apresentam valores elevados (2,0 mM Trolox/100g) que não variam com o local de colheita, nem com o tempo de extracção.

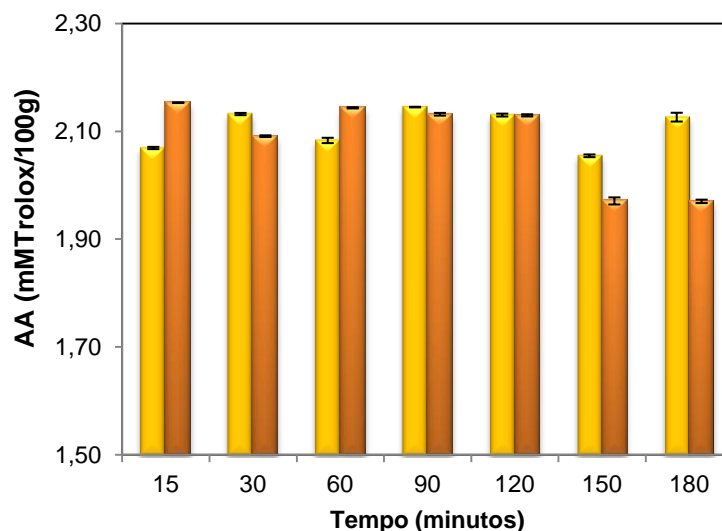


Figura 19 – Actividade antioxidante no extracto aquoso de flores carqueja, (■ amostra Malcata; ■ amostra Gardunha). As medições foram feitas em triplicado (desvio padrão  $\leq 0,008$ ).



Conclui-se que as flores da carqueja não perdem a sua actividade mesmo quando submetidas a tratamentos térmicos prolongados, 180 minutos.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com os de Luís *et al.*, (2009), no qual a AA do extracto aquoso de *P. tridentatum* apresentou valores de 1,30 mM Trolox/100g. No mesmo estudo foi considerada a AA para o extracto de *Erica spp.* e *Cytisus scoparius* sendo superior no caso de *Erica spp* 1,72 mM Trolox/100g e inferior no extracto *C. scoparius* 0,45 mM Trolox/100g.

Morais *et al.*, (2009) no seu estudo em diferentes variedades de plantas: *Pneumus boldus* Mold (Boldo); *Matriarca recutita* L. (camomila), *Cymbopogon citratus* (capim santo), *Baccharis trimera* (Less.) (Carqueja), *Camelia sinensis* (L.) (Chá verde), *Lippia alba* (Cidreira), *Mentha arvensis* L. (Hortelã) e *Pyrus malus* L. (maçã) verificaram um bom poder antioxidante das mesmas. Os valores da actividade antioxidante neste estudo foram expressos noutras unidades pelo que não podemos comparar com os obtidos nos extractos de carqueja.

Assim, o presente estudo permite concluir ser a época da floração aquela que apresenta maior interesse com vista à produção de extractos com actividade antioxidante.

#### **4.4 ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE O TEOR EM FENÓIS E A ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE PARA OS DIFERENTES EXTRACTOS**

Alguma literatura (Luís, *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2007) apresenta estudos da relação entre o teor de fenóis e a actividade antioxidante dos extractos, designadamente em ensaios com extractos de plantas.

Razali *et al.*, (2008) refere que extractos de plantas que contêm elevados níveis de compostos fenólicos têm demonstrado uma elevada actividade antioxidante.

Na perspectiva de avaliar se existe uma relação entre o teor de fenóis e a actividade antioxidante nos extractos de *P. tridentatum* efectuou-se a análise para as amostras do presente estudo (Figura 20).

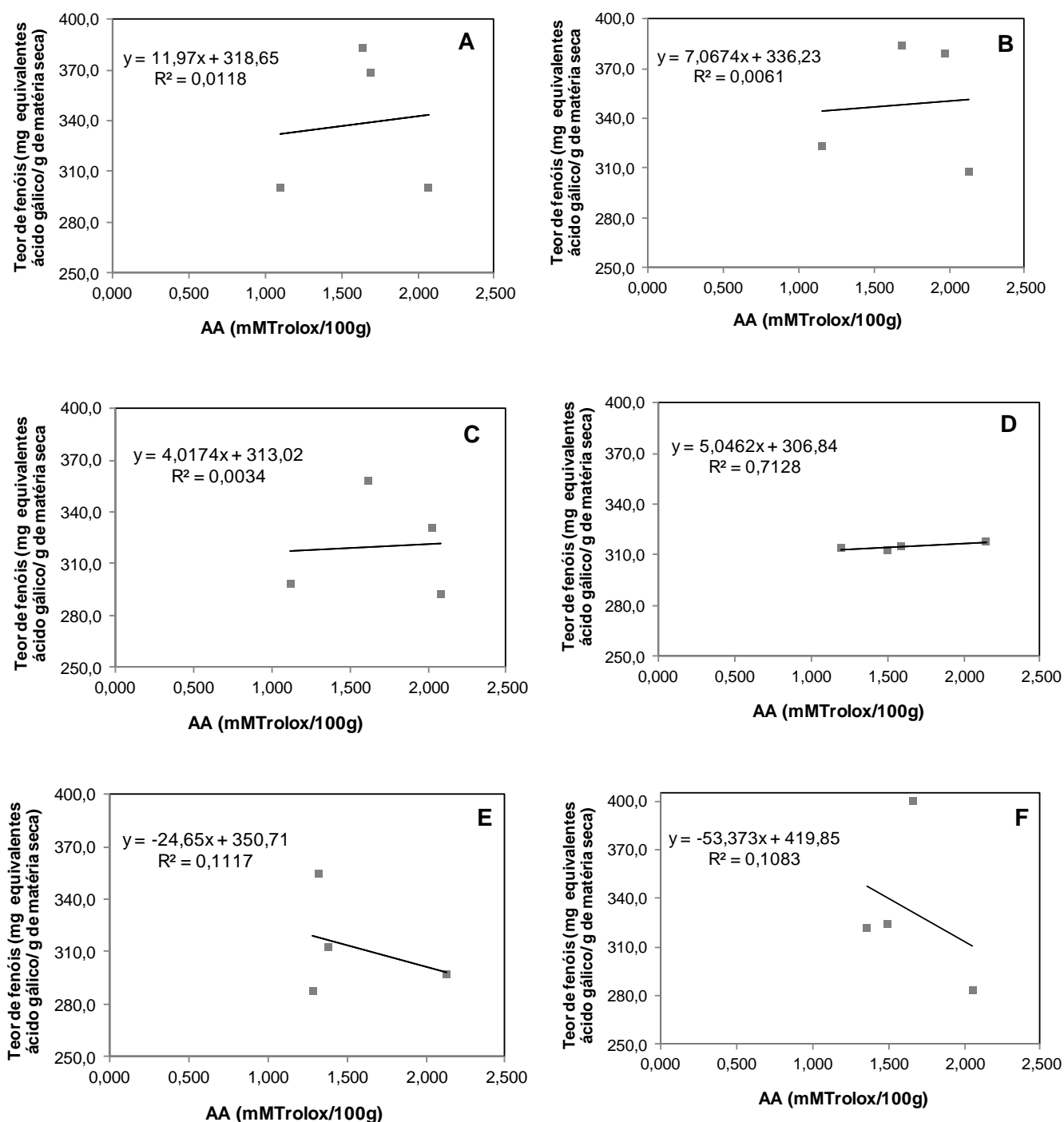


Figura 20 – Relação do teor em fenóis e a actividade antioxidante na amostra da Malcata nos vários tempos de extracção. **A** – 15 min; **B** - 30 min; **C** - 60 min; **D** - 90 min; **E** - 120 min; **F** - 150 min; **G** - 180 min.

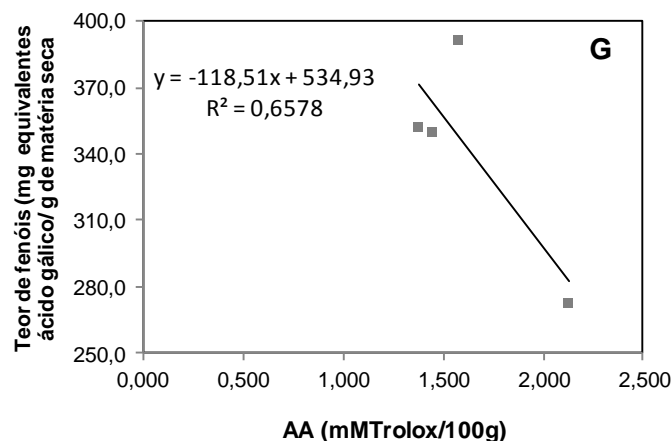


Figura 20 (cont.) – Relação do teor em fenóis e a actividade antioxidante na amostra da Malcata nos vários tempos de extracção. **A** – 15 min; **B** - 30 min; **C** - 60 min; **D** - 90 min; **E** - 120 min; **F** - 150 min; **G** - 180 min.

A análise das figuras 20 e 21 permite concluir que para a maioria dos extractos em estudo não se verifica uma relação entre o teor de fenóis e actividade antioxidante.

Apenas no caso do extracto obtido aos 90 minutos (figura 20 **D**) se observa que existe uma correlação positiva entre as duas variáveis pelo que se pode concluir que este extracto poderá ter uma componente fenólica com actividade antioxidante. Dado que esta relação só se verificou para os extractos obtidos neste ponto, tal facto deverá ser comprovado.

A mesma análise foi efectuada para as amostras da Gardunha, figura 21, tendo-se observado que não existe relação em nenhum dos extractos.

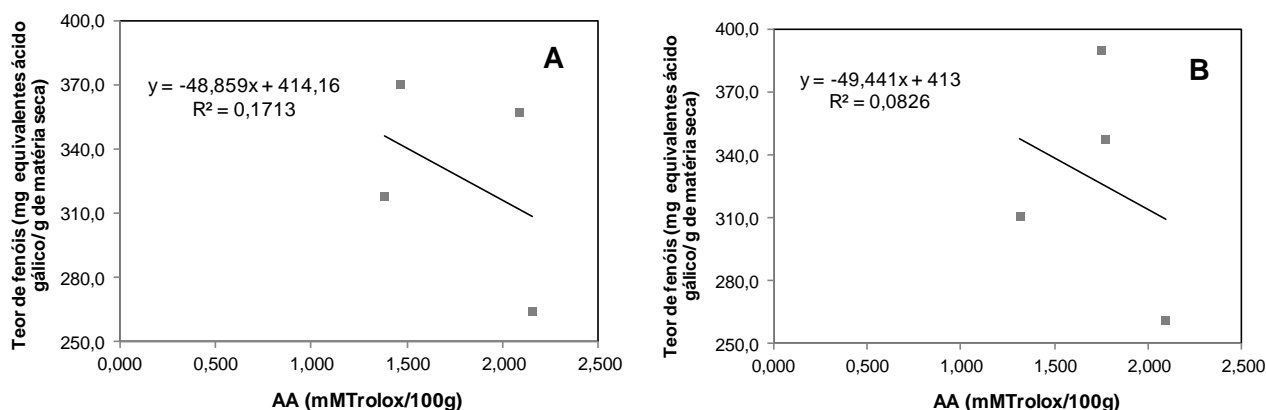
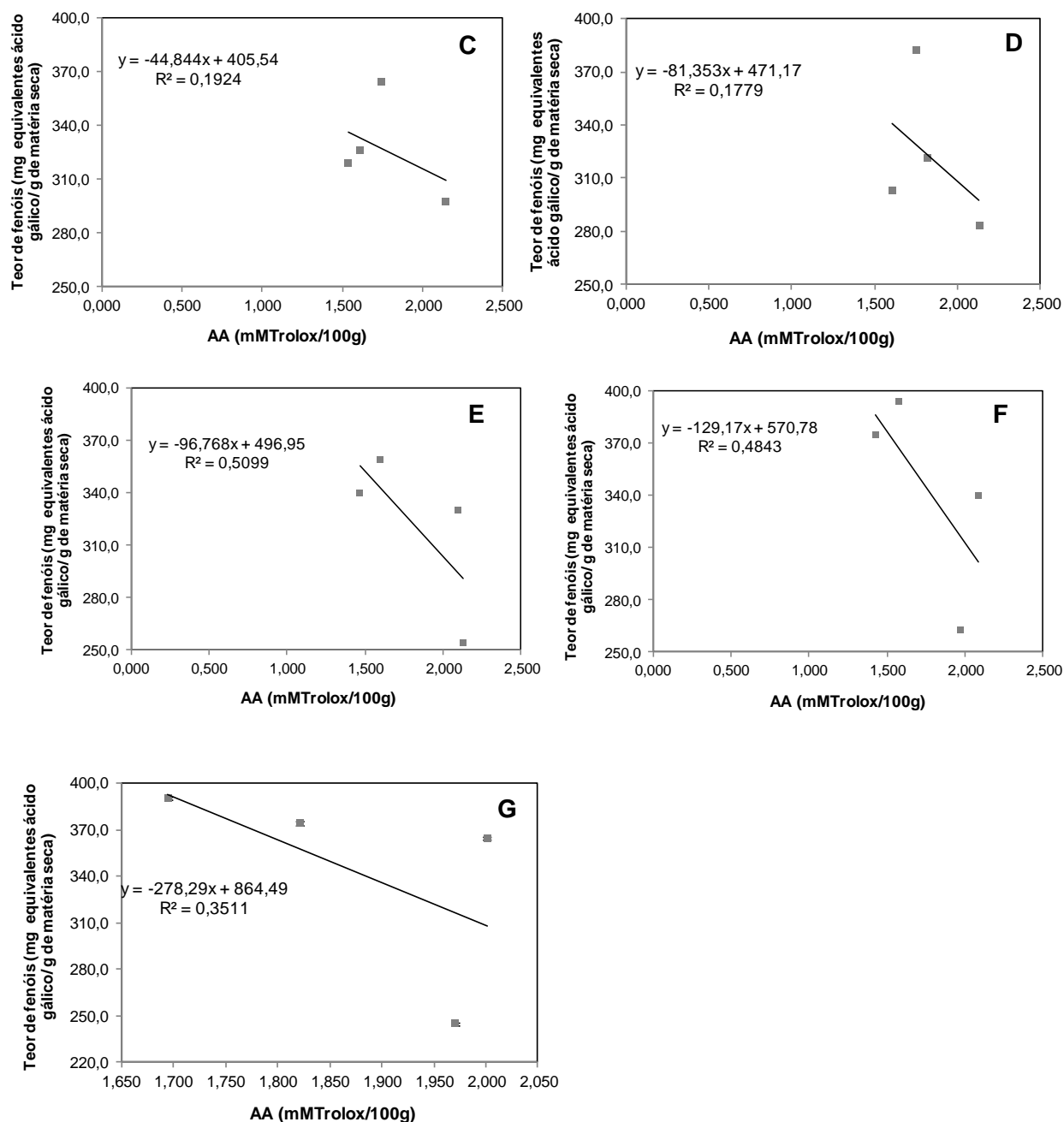


Figura 21 – Relação do teor em fenóis e a actividade antioxidante na amostra da Gardunha nos vários tempos de extracção. **A** – 15 min; **B** - 30 min; **C** - 60 min; **D** - 90 min; **E** - 120 min; **F** - 150 min; **G** - 180 min.



**Figura 21 (cont.)** – Relação do teor em fenóis e a actividade antioxidante na amostra da Gardunha nos vários tempos de extracção. **A** – 15 min; **B** - 30 min; **C** - 60 min; **D** - 90 min; **E** - 120 min; **F** - 150 min; **G** - 180 min.

O facto de não se observar uma relação directa entre o teor de fenóis e a actividade antioxidante deixa em aberto a necessidade de uma caracterização do perfil fenólico das amostras para além de uma caracterização da componente não fenólica.

## 5. CONCLUSÕES

---

O presente estudo permite retirar as seguintes conclusões:

- A carqueja (*P. tridentatum*) apresenta um rendimento em extracto aquoso muito elevado, 17,2 g extracto/100g (m.s.) a 46,0 g extracto/100g (m.s.), em qualquer das fases do ciclo vegetativo para os dois locais de produção estudados, serras da Gardunha e da Malcata. No entanto, no período do repouso vegetativo quer na amostra da Malcata quer da Gardunha o rendimento foi máximo, sendo de 46,0g extracto/100 g (m.s.) m/m (m.s) e 25,6 g extracto/100g (m.s.), respectivamente.
- O estudo do rendimento de extracção em função do tempo permite concluir que em 3 horas não se esgotam os extractáveis da planta, sendo que em 2 horas se recupera em média 75% do extracto total obtido nas 3 horas. Tendo em conta o tempo de extracção e os custos energéticos inerentes, 2 horas seria um tempo de extracção aceitável, caso se aplique a nível industrial.
- Os extractos obtidos apresentam elevados teores de fenóis. Os valores variaram entre 245 e 400 mg EAG/g (m.s.), não diferindo os valores em relação à zona de colheita.
- Conclui-se que em qualquer extracto aquosos estudado a actividade antioxidante é elevada. Na fase de floração com o extracto das flores de carqueja verifica-se um elevado valor de actividade, tanto na amostra da Serra da Malcata como na da Serra da Gardunha. O valor máximo da actividade antioxidante foi de 2,14 mMTrolox/ 100g (m.s).
- Na relação entre o teor de fenóis e a actividade para os diferentes extractos conclui-se que não se observa uma relação directa, deixando em aberto a necessidade de uma caracterização do perfil fenólico das amostras para além de uma caracterização da componente não fenólica.
- Uma análise conjunta dos resultados permite concluir o interesse da produção de extractos de carqueja sobretudo no período da floração, dado apresentarem elevada actividade antioxidante. Estes dados prevêem um elevado potencial para utilização desta planta e dos seus extractos como uma nova fonte de antioxidantes naturais para a indústria alimentar ou outras.

Para cada problema resolvido surge todo um conjunto de novas questões, de aspectos de investigação interessante e que urge esclarecer, para se poder aplicar na prática. Como perspectiva futura, é de interesse um estudo mais aprofundado dos compostos fenólicos, quais as compostos presentes nas diferentes fases do ciclo vegetativo e para os diferentes tempos de extracção, bem como a quantificação destes mesmos compostos. Outro dos estudos que seria interessante corresponde à actividade antimicrobiana presente nos extractos da carqueja.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Adegar – Associação de Defesa e Desenvolvimento da Serra da Gardunha. 1999. 1º Relatório de progresso do projecto Life – Natureza - *Asphodelus bento-rainhae* medidas de conservação e gestão (Relatório técnico-científico). Fundação

Afonso, F. J. 2001. *Elaboração de cartografia para a Serra da Gardunha com objectivos de conservação da natureza*. Trabalho fim de curso em Engenharia de Ornamento dos Recursos Naturais. Escola Superior Agrária de Castelo Branco. Castelo Branco.

Ájila, C.M., Rao, J., Prasada Rao, U. J. S. 2010. Characterization of bioactive compounds from raw and ripe *Mangifera indica* L. peel extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3406-3411.

Baptista, A. S. 2004. *Plantas aromáticas e medicinais do parque natural da Serra da Estrela – seus usos tradicionais*. Trabalho de fim de curso. Escola Superior Agrária de Castelo Branco. Castelo Branco.

Cardoso, M. 2005. *Árvores e Arbustos Medicinais e Aromáticos do Sudoeste Europeu*. BeirAmbiente – Centro Profissional de Desenvolvimento Sustentável e Eco-Turismo. Guarda.

Carreira, R. C. 2007. *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, actividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica. IBSMA. São Paulo.

Dias, C.S. 2005. *Guia das Plantas Aromáticas e Medicinais do Parque Natural do Douro Internacional*. Edição Instituto de Conservação da Natureza Parque Natural do Douro Internacional. ICN.

Esteves, M. L. 2005. *Contributo para o estudo da ecologia e da conservação de Asphodelus bento-rainhae* P. Silva. Dissertação de Mestrado em Gestão da Conservação da Natureza. Escola Superior Agrária de Castelo Branco. Castelo Branco.

Flora Ibérica, Leguminosae, *P. tridentatum*. (disponível em: [http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/07\\_10%20Pterospartum.pdf](http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/07_10%20Pterospartum.pdf), consulta: 17 de Novembro de 2011).

Franco, J. A. 1971. *Nova Flora de Portugal*. Sociedade Astória, Lda. Lisboa, Portugal. Vol. 1, 308–313.

Grosso, A., Costa, M., Ganço, L., Perreira, A., Teixeira, G., Lavado, J., Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L. 2006. Essential oil composition of *Pterospartum tridentatum* grown in Portugal. *Food Chemistry*. 102: 1083-1088.

Luís, A., Domingues, F., Gil, C., Duarte, P. 2009. Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica spp.* *Journal of Medicine Plants Research*. Vol 3 (11). 886-893.

Morais, de S. M., Cavalcanti, E. S. B., Costa, S. M. O., Aguiar, L. A. 2009. Acção antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 19 (1B): 315-320.

Oliveira, de A. C., Valentim, I. A., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H, Trevisan, M. T. S. 2009. Vegetals as natural sources of antioxidants. *Química Nova*. Vol. 32 no. 3.

Quer, P. F. 2000. *Plantas Medicinales*. Ediciones Península, S. A. Barcelona.

Ramalho, V. C., Jorge, N. 2005. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. *Química Nova*. Vol. 29 no.4.

Razali, N., Razab, R., Junit, S.M., Aziz, A.A. 2008. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). *Food Chemistry*. 111, 38-44.

Rego, F. C., Gonçalves, P. C., Silveira, S. C. 2003. *Estudo da dinâmica da vegetação. Reserva Natural da Serra da Malcata*. Relatório final de projecto Penamacor (disponível em <http://portal.icnb.pt>, consulta: 20 de Janeiro 2012).

Ribeiro, J. A., Monteiro, A. M., Silva, M. F. 2000. *Etnobotânica Plantas Bravias, Comestíveis, condimentares e Medicinais*. João Azevedo Editor. Mirandela



RNSM/DSCN - Relatório Nacional da Serra da Malcata – Direcção de Serviços de conservação da Natureza.1993. *Inventário e caracterização do Património Natural da Reserva Natural da Serra da Malcata: Fauna e Flora*. (disponível em <http://portal.icnb.pt>, acesso em 20 de Janeiro 2012)

Rodrigues, J. S. C. 2001. Contributo para o estudo etnobotânico das plantas medicinais e aromáticas no parque natural da Serra de S. Mamede. ICN-FCUL.

Sahreen, S., Khuan, M. R., Khuan, R. A. 2010. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*. 122, 1205-1211.

Scherer, R., Godoy, H. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*. 112: 654-658.

Silva, M. C. L, Costa, R. S., Santana, A. dos S., Koblitiz, M. G. B. 2010. *Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products*. Semina: Ciências Agrárias Londrina. Vol.31. no.3, 669-682.

Sousa, C. M. de M., Silva, H. R., Viera-Jr., G. M., Ayres, M. C. C., Costa, da C. L. S., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C., Barros, E. D. S., Araújo, P. M. de M., Brandão, M. S., Chaves, M. H. 2007. Fenóis totais e actividade antioxidantes de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. Vol.30, No. 2, 351-355.

Sun, J., Chu. Y., Wu, X., Liu, R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 50, p. 7449-7454,

Regulamento (CE) N.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008 *relativo aos aditivos alimentares*. (disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0016:0033:PT:PDF> consulta: 17 de Janeiro de 2012).

Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Cataneo, C., Gonzaga, L. V., Lima, A., Mancini-filho, J., Fett, R. 2008. Ácidos fenólicos e actividade antioxidantes em fruto de *Physalis peruviana* L. *Alimentos e Nutrição – Brazilian Journal of Food and Nutrition*., V.19, n.3, p. 271-276.

Vitor, R. F., Mota-Filipe, H., Teixeira, G., Borges, C., Rodrigues, A. L., Teixeira, A., Paulo, A. 2004. Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology*. 93(2-3), 367-370.

## ANEXO

Quadro A - Rendimento do extracto aquoso *P. tridentatum*, Malcata e Gardunha, nas várias fases de crescimento

Amostra Malcata					Amostra Gardunha				
Tempo (minutos)	Repouso vegetativo	Floração		Início do Repouso	Repouso Vegetativo	Floração		Início do Repouso	
		Caules	Flores			Caules	Flores		
(g extracto/ 100g m.s.)					(g extracto/ 100g m.s.)				
15	6,614	3,017	6,702	3,080	4,575	2,866	0,788	3,170	
30	12,84	6,969	15,47	7,119	9,880	6,385	4,429	7,610	
60	18,51	11,99	18,12	10,99	13,69	9,943	8,774	12,10	
90	28,15	14,53	21,04	14,09	19,18	12,61	13,94	14,96	
120	35,68	16,59	22,54	16,25	21,90	14,64	16,67	17,28	
150	39,41	18,29	24,74	17,97	23,90	16,23	17,64	18,89	
180	46,04	19,38	27,65	20,95	25,60	17,16	17,64	19,96	

Quadro B - Actividade antioxidante do extracto aquoso de carqueja da Malcata.

Amostra Malcata						
Tempo (minutos)	Repouso vegetativo	Floração		Início do Repouso		
		Caules	Flores			
mMTrolox/100g						
15	1,690 ± 0,001	1,641 ± 0,007	2,069 ± 0,002	1,101 ± 0,003		
30	1,687 ± 0,022	1,972 ± 0,009	2,132 ± 0,002	1,160 ± 0,006		
60	1,621 ± 0,007	2,027 ± 0,006	2,083 ± 0,005	1,124 ± 0,001		
90	1,529 ± 0,003	1,503 ± 0,007	2,145 ± 0,001	1,199 ± 0,004		
120	1,325 ± 0,005	1,383 ± 0,003	2,130 ± 0,003	1,287 ± 0,002		
150	1,663 ± 0,003	1,358 ± 0,002	2,054 ± 0,003	1,493 ± 0,002		
180	1,576 ± 0,001	1,377 ± 0,006	2,126 ± 0,008	1,447 ± 0,001		

Quadro C - Actividade antioxidante do extracto aquoso de carqueja da Gardunha.

Amostra Gardunha						
Tempo (minutos)	Repouso vegetativo	Floração		Início do Repouso		
		Caules	Flores			
mMTrolox/100g						
15	1,468 ± 0,003	2,088 ± 0,003	2,153 ± 0,001	1,383 ± 0,002		
30	1,751 ± 0,002	1,770 ± 0,006	2,091 ± 0,002	1,317 ± 0,006		
60	1,607 ± 0,004	1,742 ± 0,008	2,143 ± 0,001	1,535 ± 0,002		
90	1,752 ± 0,007	1,820 ± 0,001	2,132 ± 0,003	1,605 ± 0,001		
120	1,595 ± 0,004	2,093 ± 0,001	2,129 ± 0,002	1,465 ± 0,002		
150	1,577 ± 0,003	2,082 ± 0,008	1,971 ± 0,007	1,427 ± 0,001		
180	1,695 ± 0,009	2,001 ± 0,003	1,970 ± 0,003	1,821 ± 0,003		

Quadro D – Teor de fenóis do extracto aquoso de carqueja da Malcata.

Amostra Malcata				
Tempo (min)	Repouso vegetativo	Floração		Início de repouso
		Caule	Flor	
(mg equivalentes ácido gálico/ g de m. s.)				
15	368,4 ± 0,034	383,0 ± 0,025	300,5 ± 0,028	300,5 ± 0,018
30	383,7 ± 0,038	379,2 ± 0,078	307,8 ± 0,001	323,4 ± 0,027
60	358,0 ± 0,013	331,0 ± 0,016	292,2 ± 0,034	298,4 ± 0,007
90	315,0 ± 0,030	312,6 ± 0,053	318,2 ± 0,001	314,0 ± 0,006
120	354,6 ± 0,018	312,6 ± 0,022	297,0 ± 0,016	287,7 ± 0,035
150	400,0 ± 0,021	321,6 ± 0,018	283,1 ± 0,020	324,1 ± 0,038
180	391,3 ± 0,013	352,1 ± 0,059	272,7 ± 0,001	350,1 ± 0,008

Quadro E – Teor de fenóis do extracto aquoso de carqueja da Gardunha.

Amostra Gardunha				
Tempo (min)	Repouso vegetativo	Floração		Início de repouso
		Caule	Flor	
(mg equivalentes ácido gálico/ g de m.s.)				
15	370,5 ± 0,001	357,4 ± 0,006	264,4 ± 0,025	317,8 ± 0,033
30	389,9 ± 0,016	347,3 ± 0,025	261,3 ± 0,028	310,9 ± 0,007
60	326,1 ± 0,004	364,3 ± 0,066	297,7 ± 0,025	318,9 ± 0,002
90	382,3 ± 0,038	321,3 ± 0,018	283,5 ± 0,019	302,9 ± 0,013
120	359,1 ± 0,057	330,0 ± 0,009	254,0 ± 0,020	340,0 ± 0,021
150	394,1 ± 0,027	340,0 ± 0,004	262,7 ± 0,025	374,7 ± 0,037
180	390,3 ± 0,039	364,6 ± 0,043	245,0 ± 0,004	374,3 ± 0,025